Berlin 1973

ÜBER DEN KALIUMTRANSPORT BEI DER KALIUMMANGELMUTANTE ESCHERICHIA COLI B 525

von

Günter Pilwat

ÜBER DEN KALIUMTRANSPORT BEI DER KALIUMMANGELMUTANTE ESCHERICHIA COLI B 525

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
des
Fachbereichs Chemie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Günter Pilwat

aus Berlin

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Gutachter: Privatdozent Dr. U. Zimmermann
2. Gutachter: Professor Dr. Th. Günther
3. Gutachter: Professor Dr. G. Manecke
Tag der mündlichen Prüfung: 12. März 1973

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	5
2.	Experimenteller Teil	14
	2.1 Züchtung der Bakterien	14
	2.2 Wachstum der Bakterien	16
	2.3 Inkubationsmedien und Versuchsdurchführung	18
	2.4 Bestimmung des extrazellulären Raumes	21
	2.5 Bestimmung der Chloridverteilung	22
	2.6 Enzymatische Bestimmung von Glucose und Glucose-6-Phosphat	24
3.	Regulation der intrazellulären Kaliumkonzentration	26
	3.1 bei E. coli B 525	26
	3.1.1 Einfluß durch Ammoniumchlorid und Aminosäuren auf die intrazelluläre Kaliumkonzentration	29
	3.1.2 Spezifität des Histidin/Leucin-Effektes auf die Kaliumkonzentration in der Zelle	43
	3.1.3 Einfluß von Substraten auf den intrazellulären Kaliumspiegel	49
	3.2 bei E. coli B 163	63
4.	Abhängigkeit der intrazellulären Kaliumkonzentration von der extrazellulären Kaliumkonzentration im stationären Zustand bei E. coli B 525	68
	4.1 Abhängigkeit in Medien mit verschiedener Osmolalität	69

Seite

4.2 Abhängigkeit von der Natrium- und Phosphatkonzentration 79

5. Untersuchungen zur Wachstumsgeschwindigkeit von E. coli B 525 83

6. Diskussion 89

7. Zusammenfassung 108

1. EINLEITUNG

Der Stoffaustausch zwischen einer lebenden Zelle und ihrer Umgebung wird durch semipermeable Membranen kontrolliert und gesteuert. Die Selektivität der Membranen kann zu beachtlichen Verschiebungen der Elektrolyt- und Nichtelektrolytzusammensetzung der Zelle gegenüber dem Außenmilieu führen.

Besonders ausgeprägt ist die Fähigkeit von tierischen und pflanzlichen Zellen sowie von Mikroorganismen (Algen, Pilze, Bakterien), Kaliumionen selektiv aus dem umgebenden Medium im Austausch gegen Natrium- und Wasserstoffionen aufzunehmen und im Zellinnern zu akkumulieren. Dieser Entmischungszustand wird von der Zelle aufrechterhalten, so lange sie lebt.

Tracerversuche mit K-42 und Na-24 haben gezeigt, daß die Membranen für die Alkaliionen permeabel sind. Die lebende Zelle muß deshalb ständig unter Energieverbrauch Kaliumionen aus dem Medium akkumulieren und Natrium- und Wasserstoffionen in das Außenmedium transportieren, um diesen Nichtgleichgewichtszustand stationär aufrechtzuerhalten.

Man spricht von einem "aktiven", d.h. Stoffwechselenergie verbrauchenden Transport bzw. von einer aktiven Pumpe, die nach Untersuchungen am perfundierten Riesenaxon des Tintenfisches, an "ghost"-Zellen von Erythrozyten und an Bakterien und Bakterienmutanten (1) in der Zellmembran lokalisiert sein muß.

Der Mechanismus, der zu dieser asymmetrischen Verteilung der

Ionen zwischen Zelle und Außenmedium führt, ist noch weitgehend unverstanden. Es gibt eine Reihe von Modellvorstellungen wie z.B. transportvermittelnde, spezifische Membrancarrier, selektive Adsorption in der Zelle, Transport durch eine single-file Pore usw.. Kinetische Experimente lassen eine eindeutige Aussage über den vorliegenden Transportmechanismus nicht zu. Eine Isolierung des Transportcarriers gelang bisher nur für den Sulfattransport in Salmonella typhimurium (2) und für den Zuckertransport (3) (4).

In jedem Falle muß unabhängig vom Transportmechanismus ein Protein beteiligt sein, da Mutanten existieren.

Die Energie, die für den Ionentransport gegen den elektrochemischen Gradienten benötigt wird, kann einen erheblichen Anteil der Gesamtenergie, die vom Stoffwechsel der Zelle zur Verfügung steht, betragen (15 - 20 %) (5) (6).

Eine der Ursachen für diesen Energieaufwand, den die Zelle zur Einstellung eines spezifischen Ionenverteilungsmusters im Cytoplasma treibt, dürfte in der Tatsache zu suchen sein, daß Enzymreaktionen nur bei bestimmten Ionenkonzentrationen optimal ablaufen. Bis heute sind über 30 Enzymsysteme (7) (8) bekannt, die durch Kalium aktiviert werden. Rubidium und Caesium können Kalium in dieser Funktion mehr oder minder wirksam ersetzen, nicht aber Natrium oder Lithium, die zum Teil diese Reaktion sogar hemmen.

LUBIN (9) konnte z.B. nachweisen, daß Kalium in zellfreien

Extrakten von der Kaliummangelmutante E. coli B 207 den Transfer von Aminosäuren von der tRNS in Polypeptide im Gegensatz zu Natrium äußerst spezifisch stimuliert.

Mit der asymmetrischen Ionenverteilung bzw. mit der daraus resultierenden Potentialdifferenz an der Zellmembran sind die Nervenreizleitung und die sekretorischen Leistungen von verschiedenen Geweben und Organen (z.B. Niere, Magenschleimhaut, Tränendrüse usw.) auf das engste verbunden (10).

Diese nur kurz skizzierten Beziehungen zwischen selektivem Ionentransport und physiologischen und biochemischen Vorgängen weisen bereits auf die ausgeprägte Bedeutung hin, die aus medizinischer Sicht der Aufklärung des Mechanismus zukommt.

In den letzten Jahren hat sich gezeigt, daß Mutanten von Mikroorganismen, deren Kaliumtransportsystem durch Mutation defekt ist, wertvolle Hilfsmittel zur Klärung dieses Problems sein können. Es ist offensichtlich, daß durch vergleichende Messungen am intakten Transportsystem des Wildtyps Substanzen, die am Transport beteiligt sind, identifiziert und erfaßt werden können.

Auch erscheint es möglich, durch Lokalisierung der Mutation auf dem Chromosom Einblick in die genetische Kontrolle des Kaliumtransportes zu erhalten.

Die bisher isolierten Kaliummangelmutanten lassen sich nach der durch die Mutation hervorgerufenen Störung in zwei Klassen

unterteilen.

Die von DAMADIAN und SLAYMAN (11) (12) isolierten Kaliummangelmutanten von Escherichia coli B bzw. Neurospora zeigen analog zur Mehrzahl der Transportmutanten für Monosaccharide, Aminosäuren und anorganische Anionen eine veränderte Kaliumaufnahme. Die Michaelis-Menten-Konstante des Kaliuminfluxes ist bei diesen Mutanten erhöht, d.h. die Kaliumaufnahme in die Zellen ist erschwert worden.

Auch zeigt die von DAMADIAN isolierte Kaliummangelmutante RD-2 Veränderungen im Phosphattransport, obgleich durch die Mutation nur ein Gen getroffen ist. BURMEISTER (13) lokalisierte die Mutation auf dem Bakterienchromosom in der Nähe des gal-Markers.

Eine Kaliummangelmutante, die einen verstärkten Efflux aufweist und das akkumulierte Kalium nicht über längere Zeiten im Zellinnern konstant halten kann, wurde zum ersten Mal von LUBIN (14) 1960 beschrieben. Eine vorläufige Kartierung der Mutation durch LUBIN zeigte, daß die Mutation in der Nähe des Leucin-Markers liegt, d.h. in einiger Entfernung vom gal-Marker.

Auch die von HAROLD (15) und WILLIS (16) isolierten Kaliummangelmutanten von Streptococcus faecalis bzw. Bacillus subtilis müssen nach den Untersuchungen dieser Autoren zu der Klasse der Retentionsmutanten gerechnet werden. Die genetische Lokalisierung dieser Mutanten liegt für beide Stämme noch nicht vor.

Zwei vor kurzem publizierte Arbeiten von EPSTEIN et al. (17) (18) geben weiteren Aufschluß über die genetische Kontrolle des selektiven Kaliumtransportes. EPSTEIN und DAVIES isolierten 25 von einander unabhängige Kaliummangelmutanten von E. coli K 12, die im Vergleich zu ihrem Wildtyp in Medien mit niedrigen Kaliumkonzentrationen nur langsam wuchsen.

Da der Kaliumtransport nur wenig, im Sinne einer geringfügig erforderlichen höheren extrazellulären Kaliumkonzentration betroffen wurde, wurde diese Klasse der Mutanten von den beiden Autoren mit Kdp (K-dependent) bezeichnet. Der Locus der Kdp-Mutation liegt in der Nähe des gal-Markers, d.h. in Übereinstimmung mit dem Befund von BURMEISTER für die Kaliummangelmutante von DAMADIAN, die in der Kaliumaufnahme geschädigt war.

EPSTEIN und KIM (18) gelang es nun, durch erneute Mutierung der Kdp-Mutanten Doppel-Kaliummangelmutanten zu gewinnen, die eine veränderte Kaliumaufnahme bzw. Kaliumabgabe zeigten und in die bereits weiter oben erwähnten beiden Klassen der Transportmutanten eingeordnet werden müssen.

Die mutierten Gene der von diesen beiden Autoren untersuchten Mutanten Trk (A-E) sind über das gesamte Bakterienchromosom verstreut. Die Trk-Loci liegen weder nebeneinander noch in der Nähe der Kdp-Gene. Interessanterweise liegt die Retentionsmutation Trk C in der Nähe des leu-Markers, d.h. in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von LUBIN an der Retentionsmutante E. coli B 207 bzw. B 525.

Die Autoren schließen aufgrund der geringen Zahl der untersuchten Mutanten nicht aus, daß weitere Gene auf dem Bakterienchromosom den Kaliumtransport beeinflussen können. Kaliumtransportuntersuchungen an diesen Mutanten liegen noch nicht vor. Die bisher isolierten Mutanten weisen aber bereits auf einen sehr komplexen Mechanismus des Kaliumtransportes hin.

In dieser Arbeit wurde der Kaliumtransport bei der von LUBIN (14) isolierten Kaliummangelmutante E. coli B 525 und ihrem Wildtyp B 163 untersucht, für den bereits Messungen von GÜNTHER (19) und LUBOCHINSKY (20) vorliegen. Beide Stämme sind auxotroph für die Aminosäuren Histidin, Leucin und Methionin. Die Mutante B 525 benötigt nach LUBIN (21) und GÜNTHER (22) zum Wachstum erhöhte extrazelluläre Kaliumkonzentrationen. Unterhalb einer extrazellulären Kaliumkonzentration von 0,5 - 1 mMol/l wächst die Mutante nicht. Der Wildtyp B 163 wächst bereits in Gegenwart von Spuren von Kalium mit einer Generationszeit von 60 Minuten. Bei einer extrazellulären Kaliumkonzentration von 1 mMol/l beträgt dagegen bei der Mutante die Generationszeit 2,5 Stunden.

Bei steigender extrazellulärer Kaliumkonzentration nimmt die Generationszeit ab und erreicht erst bei hohen Kaliumkonzentrationen die Generationszeit des Wildtyps.

Nach LUBIN soll die Generationszeit im Konzentrationsbereich unterhalb der Sättigungskonzentration an Kalium linear von der intrazellulären Kaliumkonzentration abhängen. Seine Versuche, die kritische Kaliumkonzentration für das Wachstum der Mutante durch Veränderungen der Zusammensetzung des Außenmediums zu

verschieben, blieben erfolglos (Zugabe von diversen Aminosäuren, Uridin- und Adeninnucleotiden, Vitaminen, Temperatur- und pH-Änderungen, Substitution von Glucose durch Glycerin usw.).

Die intrazelluläre Kalium- und Natriumkonzentration in Abhängigkeit von der extrazellulären Kalium- und Natriumkonzentration, der Osmolalität und des pH-Wertes des Außenmediums sowie unter dem Einfluß von Stoffwechselinhibitoren wurden von GÜNTHER und DORN erstmalig studiert. Die für diese Arbeit wichtigsten Ergebnisse sind im folgenden zusammengefaßt:

Bei konstanter extrazellulärer Kaliumkonzentration und steigender Natriumkonzentration nimmt der intrazelluläre Kaliumgehalt beim Wildtyp B 163 nur geringfügig zu, während er bei der Mutante anfänglich erheblich absinkt und dann bei weiterer Erhöhung annähernd konstant bleibt. Bei Inkubation in natriumfreiem Medium haben Mutante und Wildtyp auch bei niedriger extrazellulärer Kaliumkonzentration fast den gleichen intrazellulären Kaliumgehalt.

Bei der Mutante wird folglich die intrazelluläre Kaliumkonzentration durch die extrazelluläre Natriumkonzentration reduziert. Umgekehrt sinkt aber auch bei der Mutante der intrazelluläre Natriumgehalt, wenn die Kaliumkonzentration im Medium erhöht wird.

GÜNTHER schloß deshalb auf eine enge Kopplung der Natrium- und Kaliumflüsse. Der Nettokaliumtransport gegen den Konzentrationsgradienten in die Zelle ist bei beiden Stämmen stoffwechselabhängig, d.h. daß auch bei der Mutante noch ein aktiver Trans-

port von Kalium vorliegt.

Da nach Messungen von LUBOCHINSKY die Kalium-42-Aufnahme bei der Mutante größer ist als beim Wildtyp, kann nach GÜNTHER der aktive Kaliumtransport in die Zelle bei B 525 nicht mutiert sein. Er vermutet deshalb eine Mutation im Kaliumefflux, wobei er darauf hinwies, daß es sich aufgrund der Beziehungen zwischen Kalium und Natrium nicht um eine einfache Erhöhung einer passiven Diffusion des Kaliums handeln kann.

Er postulierte deshalb eine Carrier-begünstigte Diffusion des Kaliums aus der Zelle und forderte weiterhin, daß durch die Mutation die Affinität des Carriers zum Kalium größer geworden sein muß und daß er gleichzeitig Natrium transportieren kann.

Eine Prüfung, ob die Vorstellung von GÜNTHER zutrifft, ist durch Analyse der stationären Kaliumverteilung zwischen Zellinnerm und Außermedium möglich. Im stationären Zustand sind Influx und Efflux gleich groß und entgegengesetzt. Da dann der Nettofluß durch die Membran gleich Null wird, läßt sich bei bestimmten Annahmen über den Durchtritt der Kaliumionen in beiden Richtungen die Abhängigkeit der Kaliumverteilung von der Außenkonzentration berechnen.

Ein Vergleich der berechneten mit der experimentell ermittelten Kaliumverteilung läßt sich aber nur durchführen, wenn die Bestimmung der Kaliumkonzentration tatsächlich im stationären Zustand erfolgt.

Da die Kaliummangelmutante E. coli B 525 in die Klasse der Mutanten fällt, die ein vermindertes Retentionsvermögen für Kalium besitzen, wurden zunächst die experimentellen Bedingungen studiert, unter denen sich ein über mehrere Stunden stabiles stationäres Gleichgewicht für Kalium bei B 525 einstellt.

Insbesondere wurde studiert, wie weit die Höhe der intrazellulären Kaliumkonzentration und das Retentionsvermögen des Kaliums in der Zelle von der Energiequelle und von der Eigenschaft des Substrates im Außenmedium abhängen.

Hinweise dafür, daß die intrazelluläre Kaliumkonzentration der Mutante B 525 im Gegensatz zum Wildtyp B 163 vom Substrat abhängt, fand bereits GÜNTHER bei Untersuchungen mit Glycerin anstelle von Glucose als Substrat im Medium (23).

Fernerhin wurde zur weiteren Charakterisierung der Mutante in Fortführung der Wachstumsversuche von LUBIN versucht, ob eine Verschiebung des Wachstumsbeginns der Mutante durch Erniedrigung der Natriumkonzentration im Medium möglich ist. Da - wie weiter oben erwähnt wurde - nach GÜNTHER die intrazelluläre Kaliumkonzentration bei niedrigen Natriumkonzentrationen zunimmt, erscheint ein solcher Versuch nach dem von LUBIN postulierten linearen Zusammenhang zwischen dem Kaliumgehalt der Zelle und der Generationsdauer aussichtsreich. Bei allen Versuchen von LUBIN betrug die extrazelluläre Natriumkonzentration etwa 100 mMol/l.

2. EXPERIMENTELLER TEIL

2.1 Züchtung der Bakterien

Die Bakterien wurden alle drei Wochen auf Schrägagarröhrchen umgezüchtet und auf ihren Bedarf an Histidin, Leucin und Methionin getestet. Die Reinheit der Kaliummangelmutante, die nur bei erhöhter extrazellulärer Kaliumkonzentration wächst, wurde durch Ausplattieren auf Agar, der nur Spuren von Kalium enthielt, geprüft.

Zur Umzüchtung wurden dem betreffenden Schrägagarröhrchen Bakterien entnommen und in aminosäure- und substratfreiem Wachstumsmedium (s.u.) suspendiert. Von dieser Suspension wurde eine Verdünnungsreihe im Verhältnis von 1:10 hergestellt.

Die einzelnen Suspensionen wurden durch Membranfilter der Porenweite 0,45 /u der Firma Millipore filtriert und die Filter in Petrischalen überführt, die durch 1,4 % Agar verfestigtes Nährmedium für coliforme Keime der Firma Millipore enthielten.

Nach 20-stündigem Wachstum im Brutschrank bei 37 °C wurden die gebildeten Kolonien mit Hilfe eines Samtstempels von einem Filter mit einer geeigneten Anzahl von Kolonien (24) auf agarverfestigtes Wachstumsmedium (s.u.) nach folgendem Schema übertragen:

Agar 1: Lactose 0,5 %, kaliumfrei, His/Leu/Met je 100 mg/l

Agar 2: " , KCl 30 mMol/l, His/Leu je 100 mg/l

Agar 3: " , " , His/Met je 100 mg/l

Agar 4: " , " , Leu/Met je 100 mg/l

Agar 5: " , " , His/Leu/Met je 100 mg/l

Die Petrischalen wurden im Brutschrank 20 Stunden lang bei 37 °C bebrütet. Anschließend wurden die gebildeten Kolonien auf den einzelnen Wachstumsagarn mit denen auf den zum Überstempeln benutzten Membranfilter verglichen.

Alle Kolonien des Wildtyps B 163 waren auf dem Agar 1 und 5 wiederzufinden, während die Mutante B 525 nur auf Agar 5 Kolonien bildete. Die Bildung von Kolonien der Mutante auf Agar 1 zeigte, daß es sich hier um Revertanten handelte und beim anschließenden Ausstreichen der Kolonien von Agar 5 wurden diejenigen nicht beachtet, die auch auf Agar 1 zu finden waren. Ein Wachstum der Bakterien auf Agar 2, 3 und 4 konnte nicht beobachtet werden.

Die durch diesen Test geprüften Kolonien auf Agar 5 von Wildtyp und Mutante wurden in Schrägagarröhrchen übertragen und nach 24-stündigem Wachstum im Brutschrank bei 37 °C im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

Alle Operationen erfolgten mit sterilen Medien und Gefäßen in einem Steril-Arbeitsplatz mit partikelfreiem Laminarluftstrom der Firma Stora Kopparberg.

2.2 Wachstum der Bakterien

Zum Wachstum wurden die Bakterien vom Schrägagar in ein steriles Wachstumsmedium der folgenden Zusammensetzung inkubiert (bezogen auf 1 Liter):

KCl		30 mMol
$MgCl_2$		1 mMol
Na_2HPO_4		90 mMol
NaH_2PO_4		30 mMol
$(NH_4)_2SO_4$		15 mMol
L-Histidin		100 mg
L-Methionin		100 mg
L-Leucin		100 mg
Lactose		5 g
pH	=	7,2

Dieses Medium unterscheidet sich von den Wachstumsmedien anderer Autoren vor allem durch seinen hohen Phosphatgehalt.

Vorversuche hatten gezeigt, daß in Medien niedriger Phosphatkonzentration (60 mMol/l) der pH-Wert nach etwa 10 Stunden rasch abfällt. Unterhalb eines pH-Wertes von 6 kommt aber das Wachstum der Bakterien fast völlig zum Erliegen. In dem obigen Wachstumsmedium bleibt dagegen wegen der hohen Pufferkapazität der pH-Wert über 16 Stunden lang annähernd konstant (s.u.), so daß eine hohe Bakterienausbeute erzielt werden kann.

Das Wachstum erfolgte bei 37 °C unter kräftiger Begasung mit

Carbogen (95 % O_2, 5 % CO_2) und wurde durch Messung der Extinktion bei 620 nm mit einem Photometer der Firma Zeiß verfolgt.

Zur Kontrolle wurde die Mutante zusätzlich in einem "kaliumfreien" Medium, d.h. im vorher beschriebenen Wachstumsmedium ohne Kaliumchlorid inkubiert, um evtl. spontane Revertanten- und Suppressorbildung während des Wachstums zu erfassen.

Wildtyp und Revertanten können bereits auf den geringen Kalium-Verunreinigungen wachsen, die durch die übrigen Komponenten des Wachstumsmediums eingeschleppt werden (s. auch S. 15).

Die stationäre Phase wurde nach etwa 16 Stunden erreicht. Die Bakterien wurden 2 Stunden später geerntet. Der pH-Wert des Mediums zu diesem Zeitpunkt betrug 6.7, die Suspensionsdichte ca. 2 g Feuchtgewicht/l Nährmedium. Die Bakterien wurden aus dem Nährmedium bei 10000 g abzentrifugiert.

2.3 Inkubationsmedien und Versuchsdurchführung

Vor der Inkubation wurden die Bakterien zweimal mit kaliumfreiem Inkubationsmedium aufgeschlämmt und abzentrifugiert, um anhaftende Reste des Nährmediums zu entfernen. Dabei sank die intrazelluläre Kaliumkonzentration auf etwa 50 mMol/l. Anschließend wurden die Bakterien mit Inkubationsmedium folgender Zusammensetzung auf eine Suspensionsdichte von 0,2 % Feuchtgewicht gebracht (bezogen auf 1 Liter):

Tris	110 mMol
HCl	90 mMol
$MgSO_4$	1 mMol
Na_2HPO_4	40 mMol
NaH_2PO_4	20 mMol
KCl	12 mMol

Der pH-Wert des Mediums betrug 7,2.

Die Zusammensetzung des Inkubationsmediums ist so gewählt, daß aufgrund der hohen Pufferkapazität die pH-Konstanz über einen langen Zeitraum (5 Stunden bei einer Bakteriensuspensionsdichte von 0,2 %) gewährleistet war. Der pH-Wert der Suspensionen brauchte deshalb nicht durch Titration mit Natronlauge, die zu einer Erhöhung der Osmolalität und der Natriumkonzentration des Mediums führt, konstant gehalten werden.

Auch läßt sich in diesem Medium die Konzentration an Natrium, Kalium und Phosphat, wie es die Messungen der Kaliumverteilung

in Abhängigkeit von der extrazellulären Kalium-Natrium-Konzentration erfordern (s. Kap. 4), ohne empfindliche Verringerung der Pufferkapazität variieren.

Je nach Versuchsbedingungen (siehe Legende bei den einzelnen Abbildungen) wurden Aminosäuren oder Ammoniumchlorid und variable Konzentrationen an Substrat hinzugefügt.

Die Suspension wurde bei 37 °C mit feuchtem Carbogen begast, um Verdampfungsverluste und damit Konzentrationsänderungen der Suspension zu vermeiden.

Zur Bestimmung der intrazellulären Kaliumkonzentration in Abhängigkeit von der Zeit bei konstanter extrazellulärer Kaliumkonzentration wurden nach verschieden langen Zeiten aliquote Teile der Suspension entnommen, abzentrifugiert und die Bakterien in Quarztiegel eingewogen. Anschließend wurden sie über Nacht bei 90 °C im Vakuum (1 Torr) getrocknet und das Trockengewicht jeder Probe bestimmt. Aus über 200 Messungen ergab sich ein mittleres Trockengewicht von etwa 23 % des Feuchtgewichtes. Die Veraschung der organischen Substanz erfolgte in einer Kaltveraschungsapparatur der Firma Tracerlab. Der Rückstand wurde mit destilliertem Wasser aufgenommen und der Gehalt an Kalium und Natrium mit dem Flammenphotometer PMQ II der Firma Zeiß bestimmt.

Die Kaliuminnenkonzentration wurde nach der von SCHULTZ und SOLOMON (25) angegebenen Gleichung berechnet:

$$[K]_i = \frac{K_t - \theta \cdot W_w \cdot [K]_o}{W_w \cdot (1 - \theta) - W_d} \qquad \text{Gl. 1}$$

$[K]_i$	=	intrazelluläre Kaliumkonzentration	[mMol/l Zellsaft]
$[K]_o$	=	Kaliumkonzentration im Medium	[mMol/l]
K_t	=	Kalium der Probe	[/uMol]
W_w	=	Feuchtgewicht	[g]
W_d	=	Trockengewicht	[g]
θ	=	anhaftendes Medium	[ml/g Feuchtgewicht]

2.4 Bestimmung des extrazellulären Raumes

Um den Kaliumgehalt der Bakterien auf Zellwasser beziehen zu können, muß nach Gl. 1 der extrazelluläre Raum bekannt sein.

Zu diesem Zweck wurde Inulin-C-14 zur Bakteriensuspension, die - siehe weiter unten - Histidin und Leucin je 100 mg/l und außerdem 1 % Glucose enthielt, hinzugegeben, die Bakterien bei 10000 g abzentrifugiert und das Feucht- und Trockengewicht bestimmt.

Anschließend wurde der Bakterienrückstand in 1 ml inaktivem Inkubationsmedium aufgeschlämmt, mit entsprechenden Mengen Aquasol der Firma NEN versetzt und die Impulsrate des an den Bakterien anhaftenden Inulin-C-14 und ebenso die von 1 ml überstehendem Medium im Tri-Carb der Firma Packard gezält. Unter diesen Bedingungen waren die Quenchfaktoren der Bakterienaufschlämmungen und der aktiven Inkubationsmediumproben gleich, so daß aus der Zählrate des überstehenden Mediums und der der Bakterien unter Berücksichtigung der eingewogenen Mengen der extrazelluläre Raum direkt berechnet werden konnte.

Aus 35 Messungen wurde der extrazelluläre Raum zu 0,27 $\pm$ 0,01 ml/g Feuchtgewicht ermittelt (siehe auch Tab. 4).

2.5 Bestimmung der Chloridverteilung

Die Chloridverteilung wurde durch Markierung mit Cl-36 bei verschiedenen Chloridaußenkonzentrationen gemessen. Da der Chloridanteil des in dieser Arbeit benutzten Mediums 90 mMol/l beträgt, wurden die Versuche im Natrium-Medium A nach DAVIS (26) durchgeführt.

Zusammensetzung des Mediums (bezogen auf 1 Liter):

Na_2HPO_4	40 mMol
NaH_2PO_4	22 mMol
Na_3Citrat	5 mMol
$MgSO_4$	0,4 mMol
$(NH_4)_2SO_4$	8 mMol

Die jeweiligen Chloridkonzentrationen wurden durch zusätzliche Einwaage von Kaliumchlorid eingestellt.

Die Bakterien wurden in markiertem Natrium-Medium A mit Histidin und Leucin je 100 mg/l und Glucose 1 % inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden bei 37 °C unter Begasung mit Carbogen wurden die Bakterien bei 10000 g abzentrifugiert und das Feucht- und Trockengewicht bestimmt.

Die weitere Behandlung der Proben und die Messung der Aktivitäten erfolgten wie bei der Bestimmung des extrazellulären Raumes.

Nach Errechnung des Gesamtchloridgehaltes der Bakterien wurde die intrazelluläre Chloridkonzentration unter Berücksichtigung der Chloridkonzentration des extrazellulären Raumes nach der für die Berechnung der intrazellulären Kaliumkonzentration angegebenen Gleichung berechnet. Die Ergebnisse sind in Tab. 3 zusammengefaßt.

2.6 Enzymatische Bestimmung von Glucose und Glucose-6-Phosphat

Zur Messung des Glucose-Verbrauchs der Bakterien unter dem Einfluß verschiedener Aminosäuren wurden die Zellen wie im Kapitel 2.3 mit 1 % Glucose inkubiert. Über einen Zeitraum von vier Stunden wurden der Suspension die Proben entnommen, durch 0,45 /u Millipore-Filter filtriert und die Filtrate bis zur Messung im Kühlschrank aufbewahrt.

Die Konzentration der Glucose wurde dann nach der Hexokinase (HK)-Methode unter Verwendung der Biochemica-Test-Combination der Firma Boehringer Mannheim GmbH bestimmt. Aus der zeitlichen Abnahme der Glucosekonzentration im Außenmedium wurde der Glucoseverbrauch der eingesetzten Bakterienmenge errechnet.

Die Glucose-6-Phosphat-Konzentration in den Zellen erfolgte nach einer modifizierten Methode von LOWRY et al. (27). Die Bakterien wurden wie oben beschrieben inkubiert. Nach verschiedennen Zeiten wurden aliquote Teile der Suspension durch 0,45 /u Millipore-Filter filtriert, die Filter ohne Nachwaschen sofort in Reagenzgläser überführt und mit flüssiger Luft gekühlt. Die spröder Filter wurden mit einem Spatel zerkleinert und bis zur weiteren Aufarbeitung über Trockeneis aufbewahrt.

In die kalten Reagenzgläser wurde kalte 0,3 n Perchlorsäure, die 1 mMol/l Äthylendiamintetraessigsäure enthielt, pipettiert, gründlich geschüttelt, der Extrakt in Zentrifugenbecher überführt und bei 100000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit

festem Kaliumcarbonat bei 0 °C neutralisiert und das entstandene Kaliumperchlorat durch Filtration entfernt.

Die Bestimmung der Glucose-6-Phosphat-Konzentration der Lösung erfolgte wie bei der Glucosebestimmung durch Messung der Extinktionszunahme bei 340 nm durch NADPH, das bei der durch G6P-DH katalysierten Dehydrierung von G-6-P gebildet wird.

3. REGULATION DER INTRAZELLULÄREN KALIUMKONZENTRATION

3.1 bei E. coli B 525

Die Kaliummangelmutante E. coli B 525 zeigt, wie bereits erwähnt wurde, einen Defekt in der Retention des Kaliums in der Zelle. Messungen der intrazellulären Kaliumkonzentration über mehrere Stunden zeigen, daß der Kaliumspiegel in der Zelle trotz konstanter extrazellulärer Kaliumkonzentration sinkt, wenn die Bakterien in das Inkubationsmedium (s. Seite 18) mit 1 % Glucose als Substrat inkubiert werden. Nach Abb. 1 steigt bei Zugabe von 1 % Glucose die intrazelluläre Kaliumkonzentration innerhalb weniger Minuten zunächst auf einen Wert von etwa 180 - 200 mMol/l (Phase I) und fällt dann im Verlauf von vier Stunden stetig bis auf einen Endwert von etwa 60 mMol/l ab (Phase II). Diese Kaliumabnahme wird nicht durch eine entsprechende Natriumaufnahme kompensiert. Warburgmessungen (s. Tab. 1) und Ausplattieren aliquoter Anteile/Stunde auf Agar lieferten keine Anhaltspunkte für ein teilweises Absterben der Bakterien, das ein Absinken des Kaliumgehaltes erklären könnte. Die Abnahme der Kaliumkonzentration in der Zelle ist von der Glucosekonzentration im Inkubationsmedium abhängig (Abb. 2). Nur die Abnahme bei Glucosekonzentrationen von 0,02 und 0,1 % läßt sich durch Verbrauch der Glucose im Medium nach 15 Minuten bzw. 90 Minuten energetisch erklären.

Die folgenden Untersuchungen beschäftigten sich deshalb mit den Bedingungen, unter denen sich für die Mutante eine für mehrere Stunden stabile intrazelluläre Kaliumkonzentration einstellt (28).

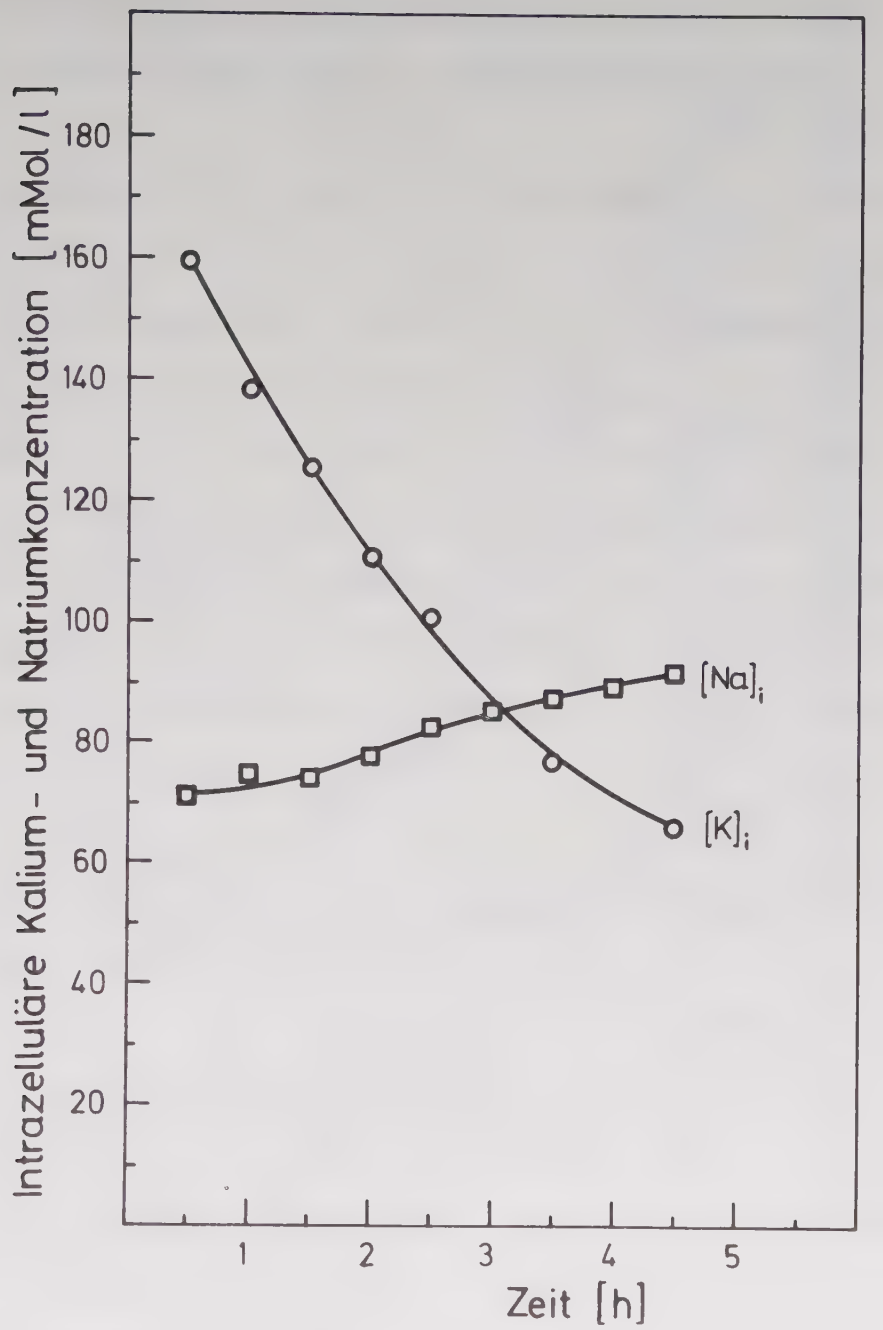

Abb. 1: Intrazelluläre Kalium- und Natriumkonzentration bei E. coli B 525 als Funktion der Zeit bei Inkubation in Medium mit 1 % Glucose. Die eingezeichneten Werte sind Mittelwerte aus drei Messungen.

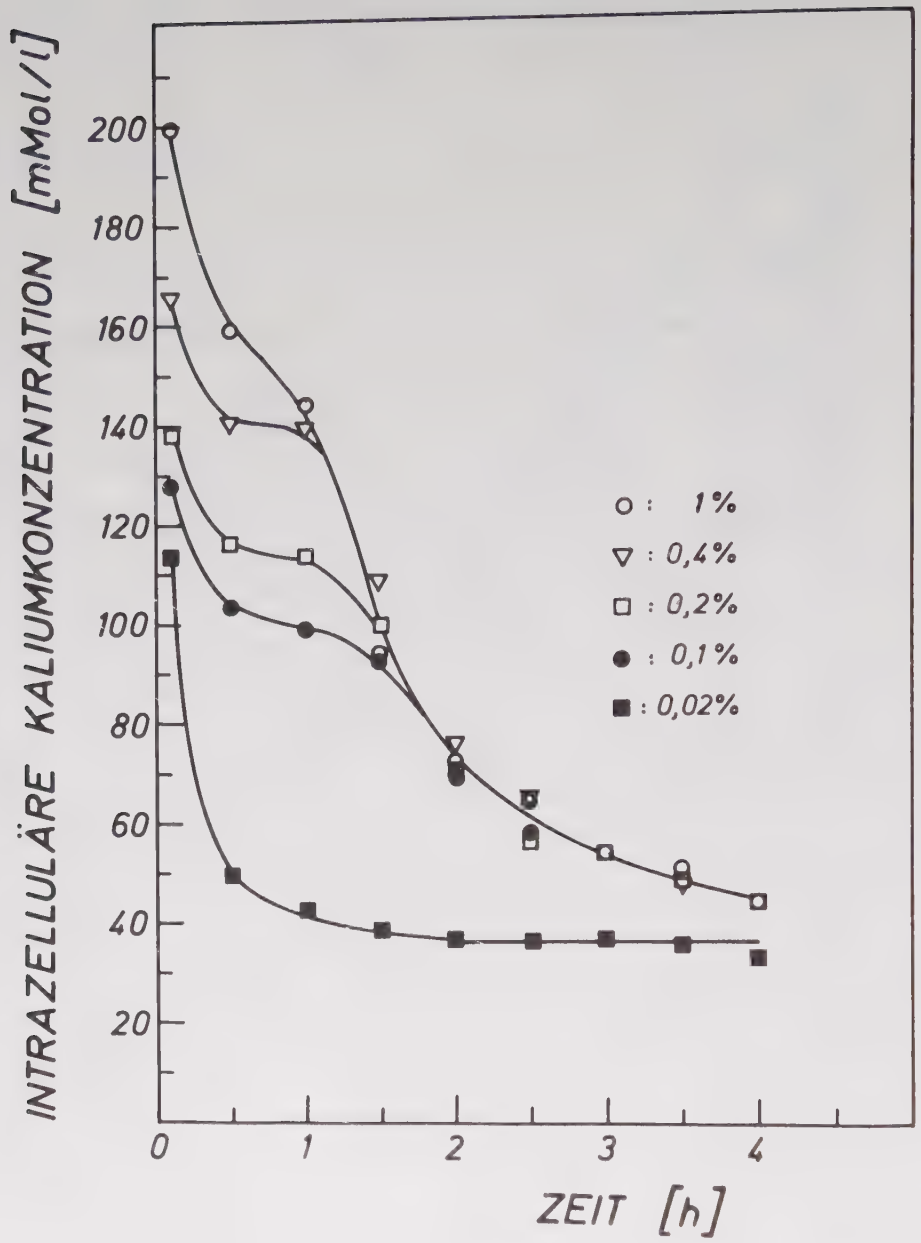

Abb. 2: Einfluß der Glucose-Außenkonzentration (0,02 , 0,1 , 0,2 , 0,4 und 1 %) auf die zeitliche intrazelluläre Kaliumkonzentration bei E. coli B 525 im aminosäurefreien Medium.

Die eingezeichneten Werte sind Mittelwerte aus drei Meßreihen mit je zwei Meßwerten.

3.1.1 Einfluß durch Ammoniumchlorid und Aminosäuren auf die intrazelluläre Kaliumkonzentration

Ammonium kann, wie man der Abb. 3 entnimmt, die Abnahme der Kaliuminnenkonzentration verhindern. Die optimale Ammoniumkonzentration liegt bei 20 mMol/l. Die Kaliuminnenkonzentration steigt unter diesen Bedingungen ebenfalls zunächst auf einen maximalen Wert von etwa 180 - 190 mMol/l, sinkt im Verlauf von zwei Stunden langsam ab, pendelt sich aber im Gegensatz zu den Versuchen in Inkubationsmedien ohne Ammoniumchlorid auf einen neuen stationären Wert von 140 - 150 mMol/l Kalium ein. Diese Kaliuminnenkonzentration bleibt im Durchschnitt über 5 Stunden konstant.

Der zeitliche Kaliumverlauf in der Zelle läßt sich demnach in drei Phasen unterteilen:

Phase I: Schnelle Aufnahme von Kalium in die Zelle (etwa 5 Minuten)

Phase II: Langsame Abnahme der intrazellulären Kaliumkonzentration (1 - 2 Stunden)

Phase III: Stationärer Endzustand (2 - 7 Stunden)

Die stationäre Kaliumkonzentration, die sich in Gegenwart von Ammonium in den Zellen von B 525 einstellt, hängt von der Ammoniumkonzentration ab. Nach Abb. 3 nimmt sie mit steigender Ammoniumkonzentration ab. Diese Abnahme läßt sich wahrscheinlich durch Überlagerung einer kompetitiven Hemmung des Kaliumtransportes durch Ammonium deuten.

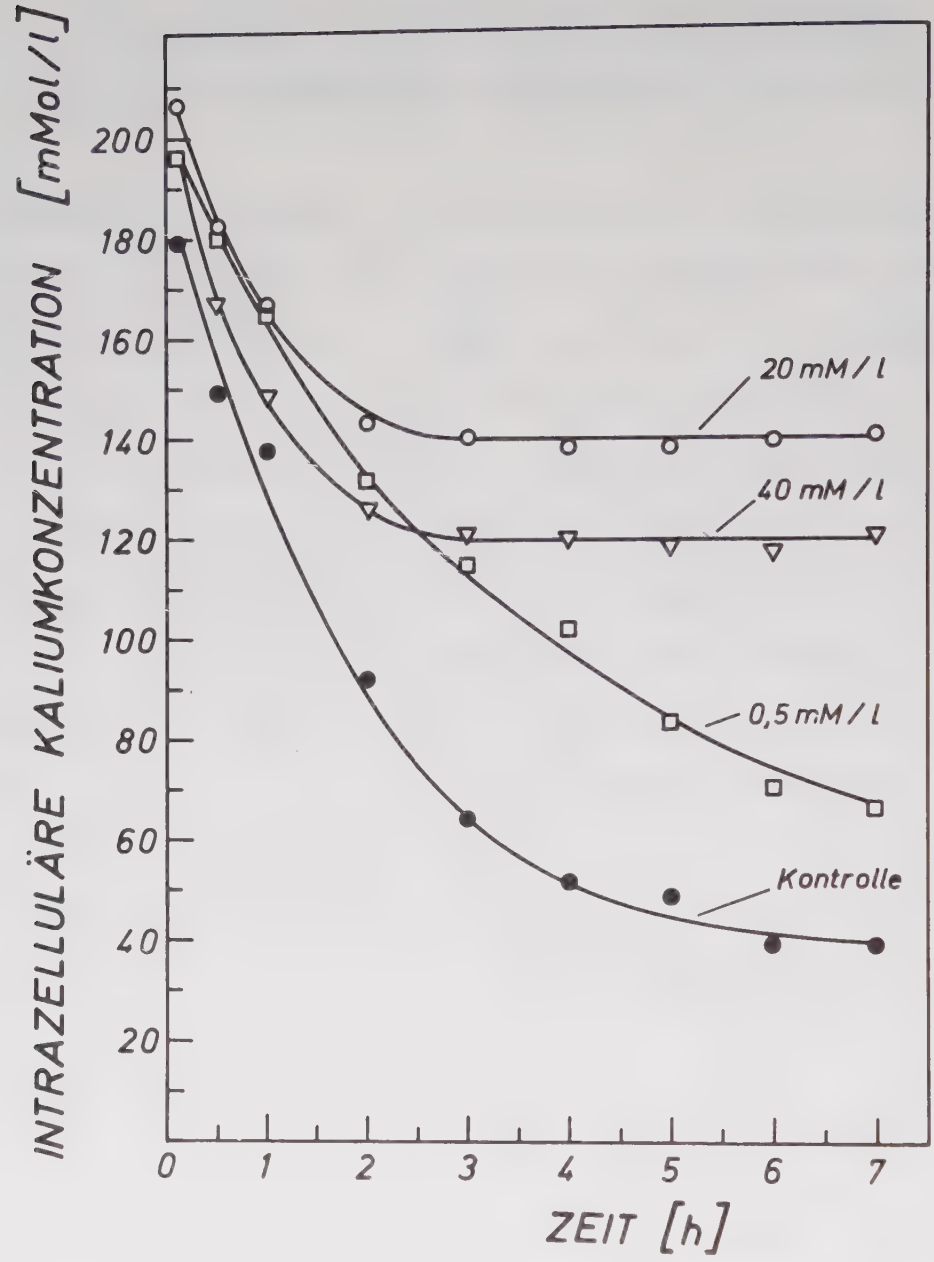

Abb. 3: Zeitlicher Verlauf der intrazellulären Kaliumkonzentration bei E. coli B 525 bei verschiedenen Ammoniumchlorid-Konzentrationen (0,5 , 20 und 40 mMol/l). Die Glucosekonzentration im Medium war 1 %. Kontrolle enthielt kein Ammoniumchlorid.

Die eingezeichneten Werte sind Mittelwerte aus zwei Meßreihen mit je zwei Meßwerten.

Die Transporteigenschaft der Bakterien nach 4 bis 5 Stunden unter den Versuchsbedingungen der Abb. 1 lassen sich durch Zugabe von 20 mMol/l Ammonium zu diesem Zeitpunkt testen. Aus der Abb. 4 ersieht man, daß die Kaliuminnenkonzentration annähernd den Wert wieder erreicht, auf den sie sich in Inkubationsmedien mit 20 mMol/l Ammoniumchlorid eingestellt hat.

Die Möglichkeit, daß Ammonium als Stickstoffquelle für am Transport beteiligte Proteine, die eine hohe Turnover-Rate haben, benötigt wird, kann ausgeschlossen werden, da Chloramphenicol, das in einer Konzentration von 50 mg/l zu Beginn und zu verschiedenen Zeiten nach der Inkubation zur Suspension hinzugegeben wurde, keine Änderung der Kaliuminnenkonzentration bewirkte (10 Messungen).

Dieses Resultat stimmt mit den Untersuchungen von LUBIN an E. coli B 207 und von SCHULTZ und SOLOMON (25) an E. coli K 12 überein. Die beiden letzteren Autoren konnten aber darüberhinaus bei E. coli K 12 auch keinen Einfluß von Ammoniumchlorid auf die Natrium- und Kaliumflüsse sowie auf die Kaliuminnenkonzentration feststellen.

Der überraschende Einfluß der Ammoniumionen auf die Konstanz der stationären Kaliumverteilung in B 525 über mehrere Stunden legte deshalb nahe, den Einfluß der essentiellen Aminosäuren zu untersuchen.

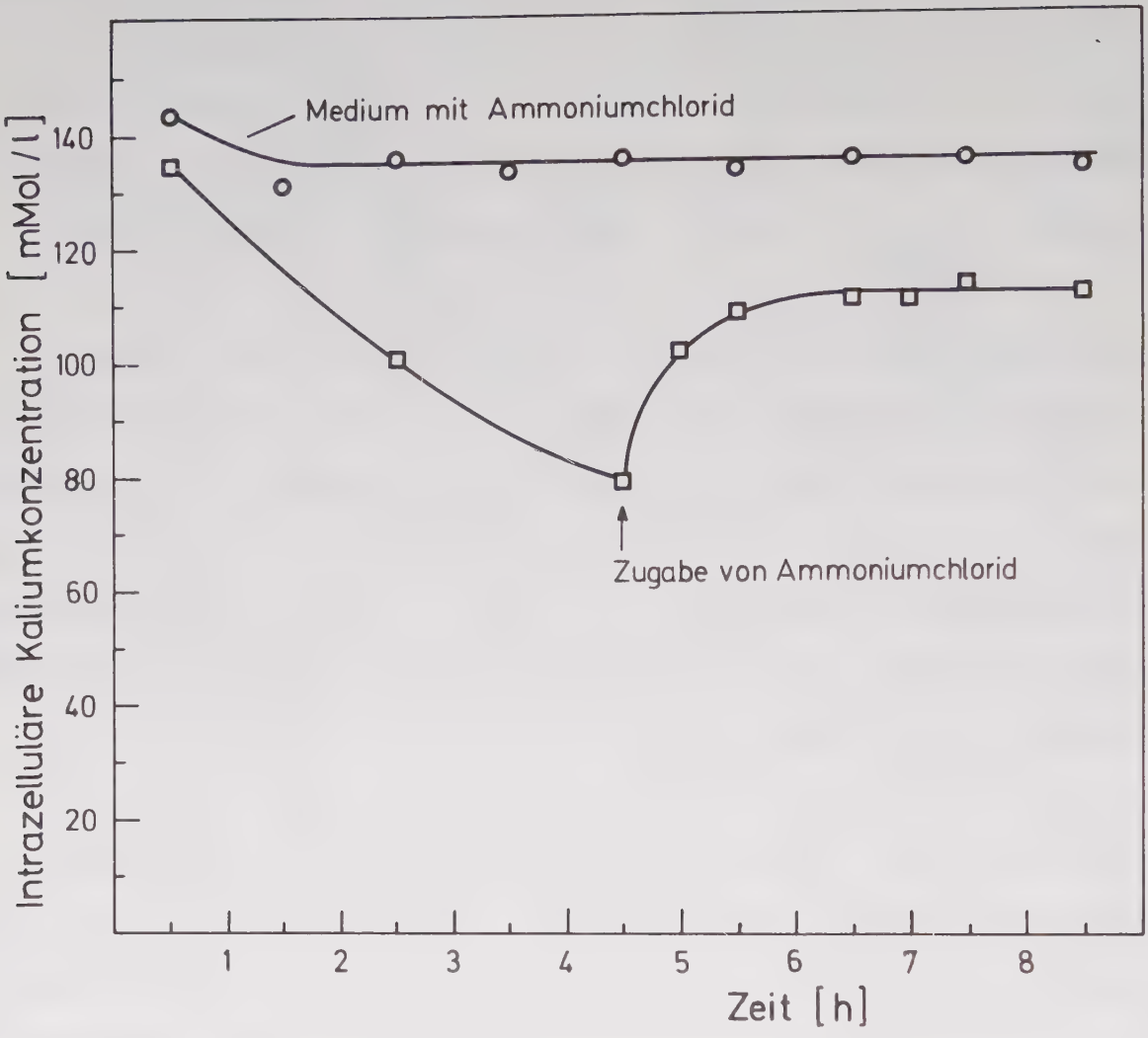

Abb. 4: Einfluß von Ammoniumchlorid (20 mMol/l) auf die intrazelluläre Kaliumkonzentration von E. coli B 525 nach einer Inkubationszeit von 4,5 Stunden im Medium mit 1 % Glucose.

Die eingezeichneten Werte sind Mittelwerte aus zwei Meßreihen mit je drei Meßwerten.

GÜNTHER, LUBIN und LUBOCHINSKY verwendeten Medien, die - wenn nicht unter Wachstumsbedingungen gearbeitet wurde - die drei essentiellen Aminosäuren Histidin, Leucin und Methionin nicht enthielten. Dadurch sollte das Wachstum während der Versuchsdauer unterbunden werden. Dieses Ziel läßt sich aber auch erreichen, wenn nur eine dieser Aminosäuren im Medium fehlt.

Die Zugabe von jeweils einer der drei möglichen Aminosäurekombinationen führt zu Resultaten, die in Abb. 5 zusammengefaßt sind. Die Konzentration an Aminosäuren betrug wie im Nährmedium jeweils 100 mg/l. Wie man der Abb. 5 entnehmen kann, haben die Aminosäurepaare Histidin/Methionin und Leucin/Methionin keinen ausgeprägten Einfluß auf die Höhe und die Stabilität der Kaliuminnenkonzentration. Der Abfall der intrazellulären Kaliumkonzentration erfolgt aber langsamer als ohne Aminosäuren.

Nach Zugabe des Aminosäurepaares Histidin/Leucin stellt sich dagegen nach Durchlaufen einer maximalen intrazellulären Kaliumkonzentration eine über mehrere Stunden konstante Kaliuminnenkonzentration ein, die im Durchschnitt um etwa 20 mMol/l höher liegt als im Medium mit 20 mMol/l Ammoniumchlorid.

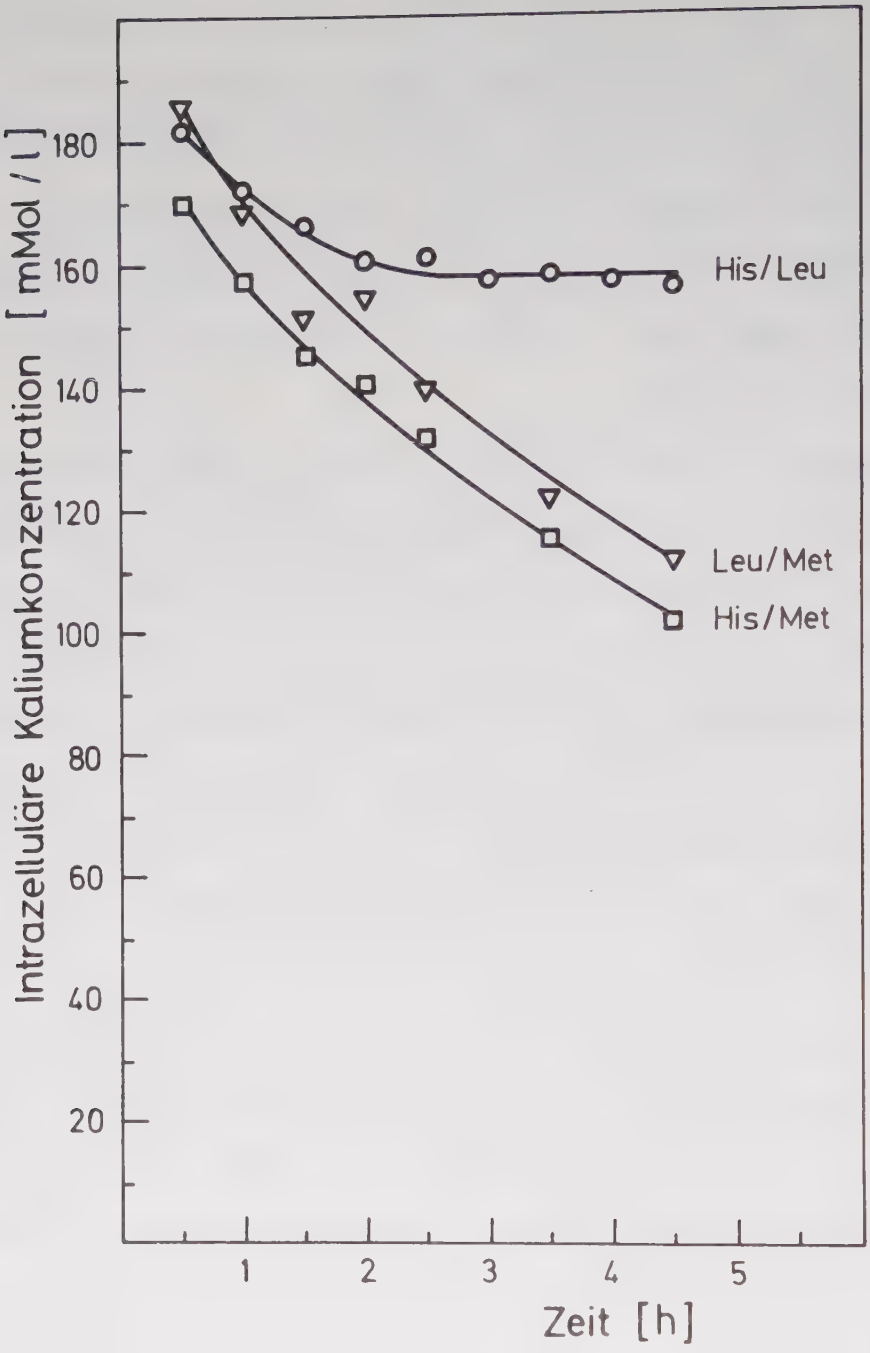

Abb. 5: Intrazelluläre Kaliumkonzentration bei E. coli B 525 als Funktion der Zeit bei Inkubation in Medium, das 1 % Glucose und jeweils zusätzlich die Aminosäuren Histidin und Leucin, Leucin und Methionin bzw. Histidin und Methionen enthält. Die Konzentration der Aminosäuren beträgt jeweils 100 mg/l. Die eingezeichneten Werte sind Mittelwerte aus zwei Meßreihen mit je zwei Meßwerten.

Zur Sicherung dieses Effektes wurde in weiteren Experimenten zu Medien, die 20 mMol/l Ammoniumchlorid enthielten und in denen sich eine konstante Kaliuminnenkonzentration in den Bakterien eingestellt hatte, nach zwei Stunden je 100 mg/l Histidin und Leucin zusammen zugegeben. Die Kaliuminnenkonzentration (Abb. 6) steigt nach Zugabe dieser beiden Aminosäuren innerhalb einer halben Stunde in den meisten Fällen um 30 mMol/l auf den Wert von 180 mMol/l, der der maximalen Kaliuminnenkonzentration am Anfang der Inkubation entspricht.

Um einen eventuell unterschiedlichen Einfluß der beiden Aminosäuren auf diese Kaliumaufnahme, die zusätzlich zur stationären Kaliuminnenkonzentration in Gegenwart von Ammoniumchlorid erfolgt, zu erfassen, wurde unter den experimentellen Bedingungen der Abb. 6 je eine dieser Aminosäuren hinzugegeben (Abb. 7).

Während Histidin (wie auch Methionin) nur eine geringe zusätzliche Aufnahme an Kalium bewirkt, führt die Zugabe von Leucin zu einer mit der Aminosäurekombination Histidin/Leucin vergleichbaren Akkumulation an Kalium. Im Unterschied hierzu fällt der Kaliumgehalt nach einer Stunde wieder ab.

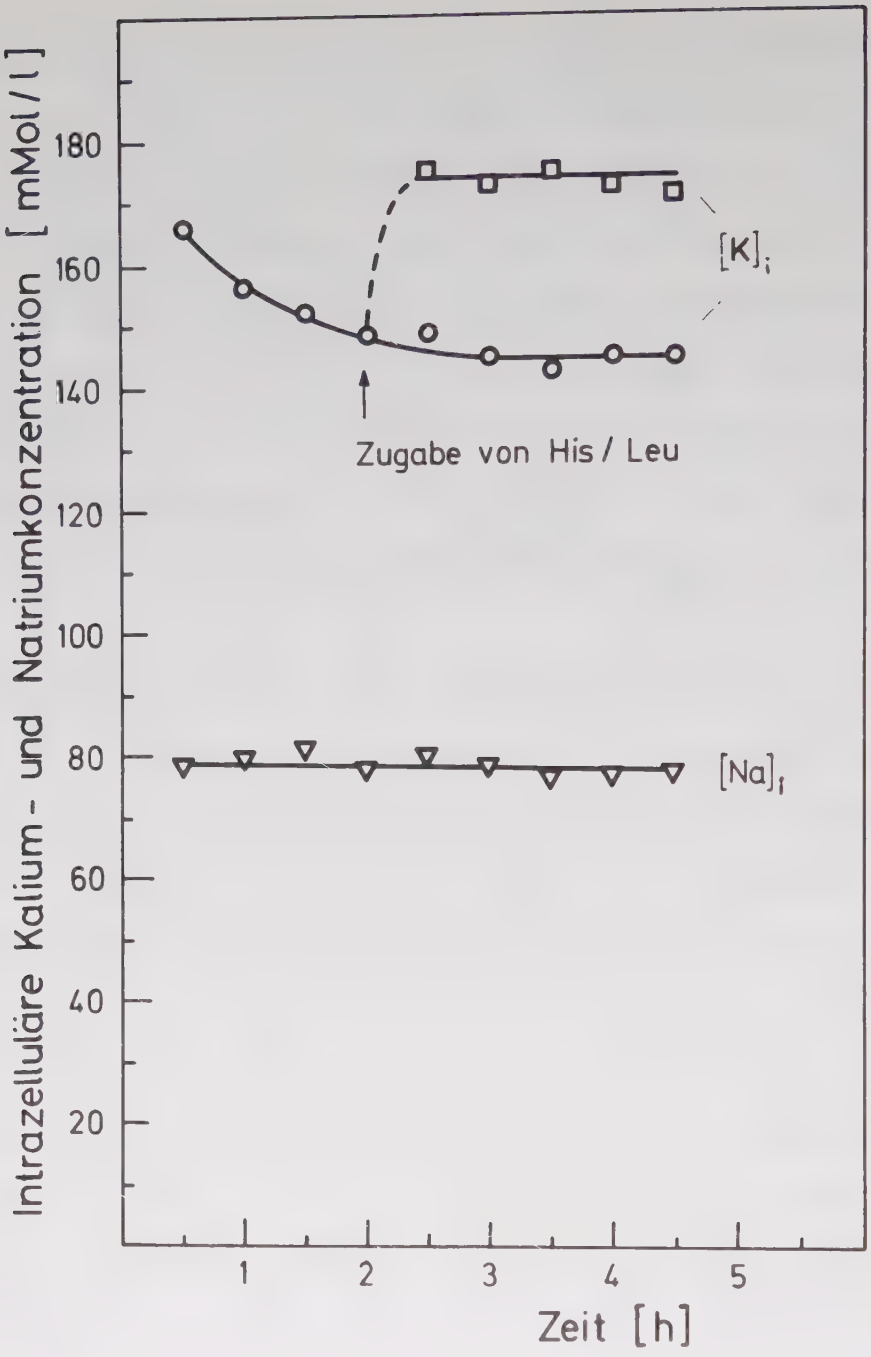

Abb. 6: Einfluß der Aminosäuren Histidin und Leucin auf die intrazelluläre Kaliumkonzentration bei E. coli B 525 nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden in einem Medium mit 20 mMol/l Ammoniumchlorid und 1 % Glucose. Die Suspension wurde nach zwei Stunden geteilt und einem Teil die Aminosäuren (je 100 mg/l) hinzugegeben. Die eingezeichneten Werte sind Mittelwerte aus fünf Meßreihen mit je zwei Meßwerten.

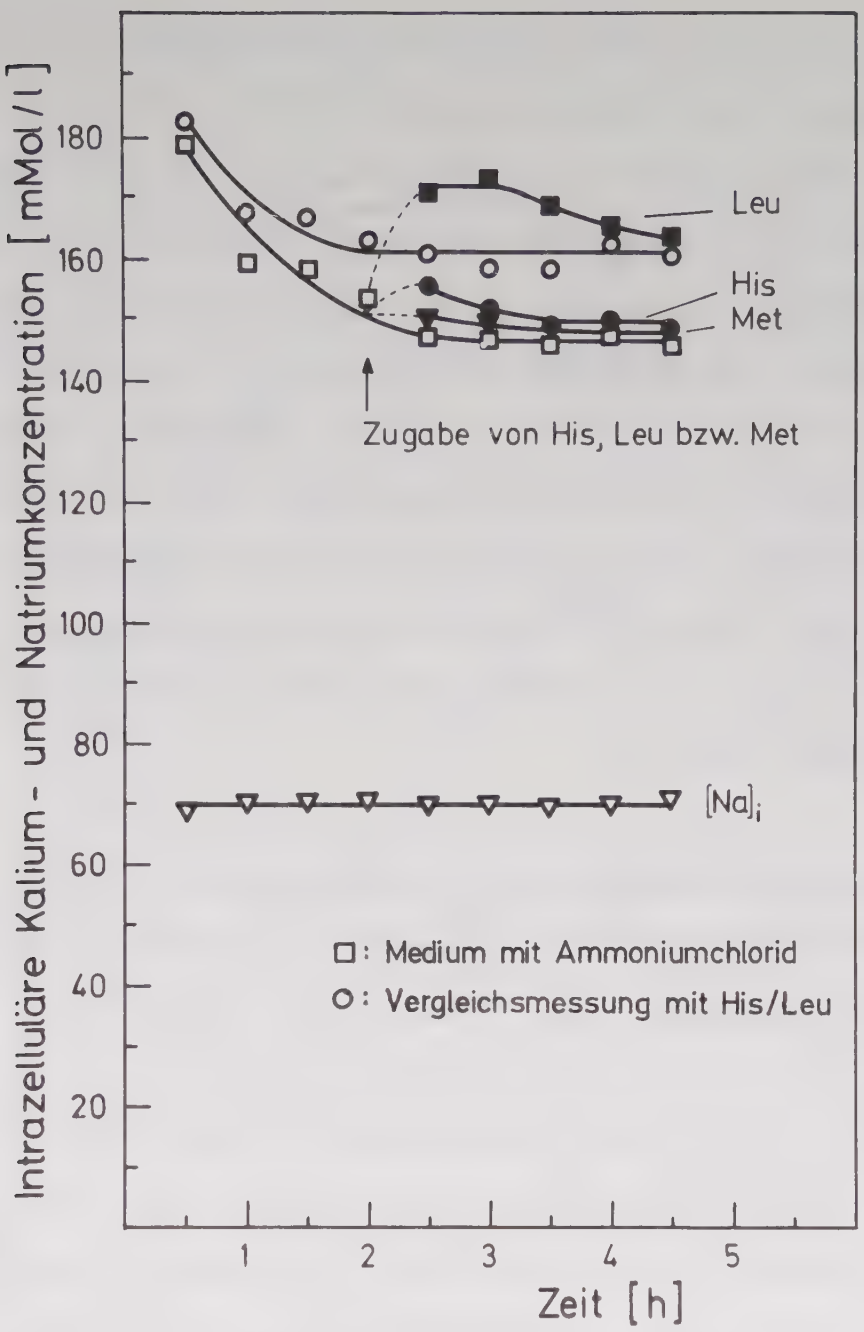

Abb. 7: Einfluß der Aminosäuren Histidin, Leucin bzw. Methionin auf die intrazelluläre Kaliumkonzentration bei E. coli B 525 nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden in einem Medium mit 20 mMol/l Ammoniumchlorid und 1 % Glucose. Die Suspension wurde nach 2 Stunden geteilt und den einzelnen Teilen je 100 mg/l der betreffenden Aminosäure hinzugefügt.
Die eingezeichneten Werte sind Mittelwerte aus zwei Meßreihen mit je zwei Meßwerten.

Abb. 8 gibt die Leucin- und Histidin-Aufnahme in den Bakterien nach radioaktiver Markierung mit C-14 in einem Medium mit 20 mMol/l Ammoniumchlorid nach Einstellung des stationären Zustandes wieder. Ein vergleich der Abbildungen 7 und 8 zeigt, daß einer Zunahme von 25 mMol/l Kalium in den Zellen eine Aufnahme von 7 mMol/l Leucin und einer von 5 mMol/l Kalium eine von 3 mMol/l Histidin entspricht. Leucin und Histidin werden demzufolge gegenüber der Außenkonzentration um einen Faktor 12 bzw. 5 im Zellinnern angereichert. Diesen Anreicherungsfaktor findet man auch unter den Versuchsbedingungen der Abb. 5 bei sofortiger Zugabe von Histidin-C-14 und Leucin-C-14 zum Inkubationsmedium (Abb. 8).

Während der Änderung des Kaliumgehaltes im Zellinnern bleibt die Natriumkonzentration unter allen Versuchsbedingungen, wie man den Abbildungen 6 und 7 entnimmt, konstant.

In Abb. 9 ist die Kaliuminnenkonzentration als Funktion der Zeit bei verschiedenen Konzentrationen an Histidin und Leucin wiedergegeben. Man entnimmt der Abbildung, daß Konzentrationen bis 1 mg/l nicht die Abnahme der intrazellulären Kaliumkonzentration verhindern können. Ab 20 mg/l wird erst eine annähernde konstante Kaliuminnenkonzentration erreicht, die aber mit 30 mMol/l tiefer liegt als die bei 100 mg/l Aminosäureaußenkonzentration. Weitere Erhöhung der Aminosäurekonzentration (untersucht bis 10 mMol/l) wirkt sich auf die intrazelluläre Kaliumkonzentration in der Phase III nicht mehr aus.

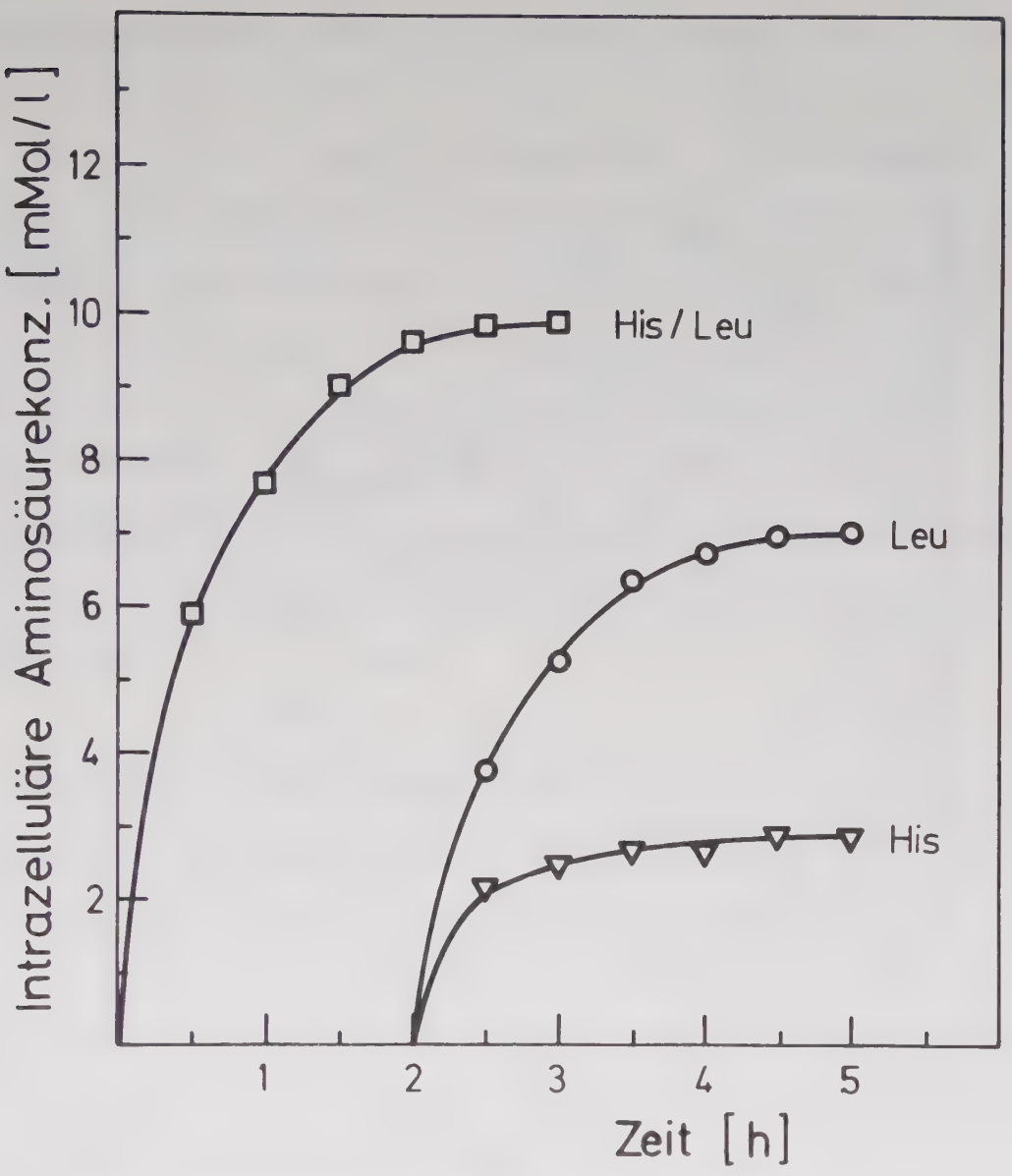

Abb. 8: Aufnahme von Histidin und Leucin in E. coli B 525 bei einer Außenkonzentration von 100 mg/l (0,645 mMol/l) Histidin und 100 mg/l (0,762 mMol/l) Leucin.

□ : Zugabe von Histidin-C-14 und Leucin-C-14 unter den Versuchsbedingungen der Abb. 5.

○, ▽ : Zugabe von Histidin-C-14 bzw. Leucin-C-14 unter den Versuchsbedingungen der Abb. 7.

Die eingezeichneten Werte sind Mittelwerte aus zwei Meßreihen mit je zwei Meßwerten.

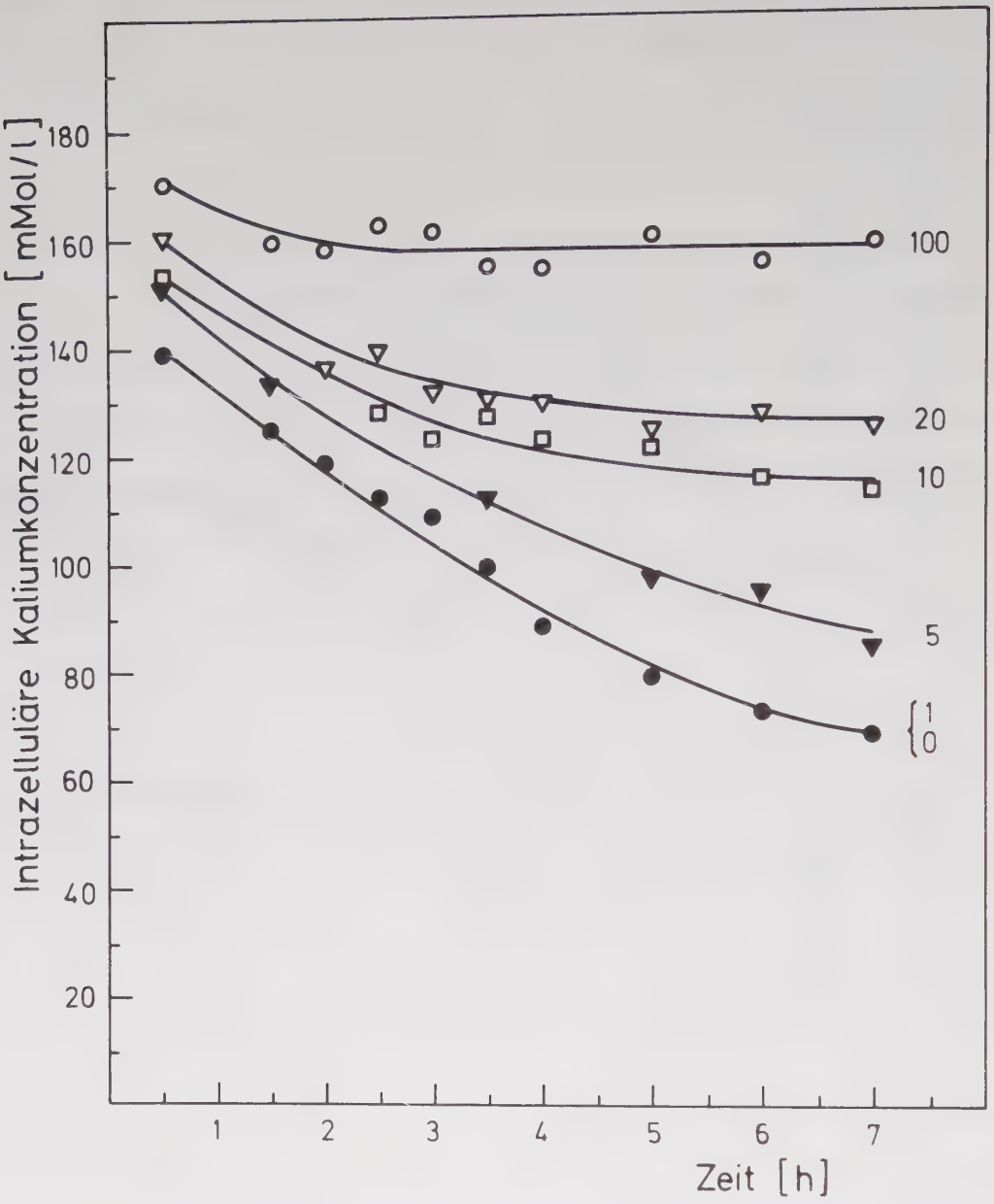

Abb. 9: Intrazelluläre Kaliumkonzentration bei E. coli B 525 als Funktion der Zeit bei Inkubation in ein Medium mit 1 % Glucose, das zusätzlich steigende Histidin- und Leucinkonzentrationen (0 bis 100 mg/l) enthält. Die eingezeichneten Werte sind Werte von zwei Meßreihen mit je einem Meßwert.

Nach Abb. 10 wird die Höhe des Kaliumspiegels in der Zelle (Phase I) und der Verlauf der Kaliumkonzentration in den Phasen II und III durch die Glucosekonzentration im Medium bestimmt. Die Kaliumkonzentration in der Phase III nimmt bei Erhöhung der Glucosekonzentration von 0,4 % auf 1 % um etwa 25 mMol/l zu. Bei weiterer Zugabe von Glucose nimmt sie dagegen wieder leicht ab. Die intrazelluläre Kaliumkonzentration in der Phase I steigt demgegenüber stetig von niedrigen zu höheren Glucosekonzentrationen an. Entsprechend nimmt die Geschwindigkeit der Kaliumabnahme bis zum Erreichen des stationären Endwertes zu.

Diese Änderungen im Kaliumgehalt der Zelle lassen sich nicht durch die Osmolalitätsänderungen im Außenmedium nach Zugabe der verschiedenen Glucosekonzentrationen erklären.

Bei Glucosekonzentrationen von 0,1 % und 0,02 % ist die Abnahme der intrazellulären Kaliumkonzentration ebenso wie in Medien ohne His/Leu (Abb. 2) energetisch bedingt.

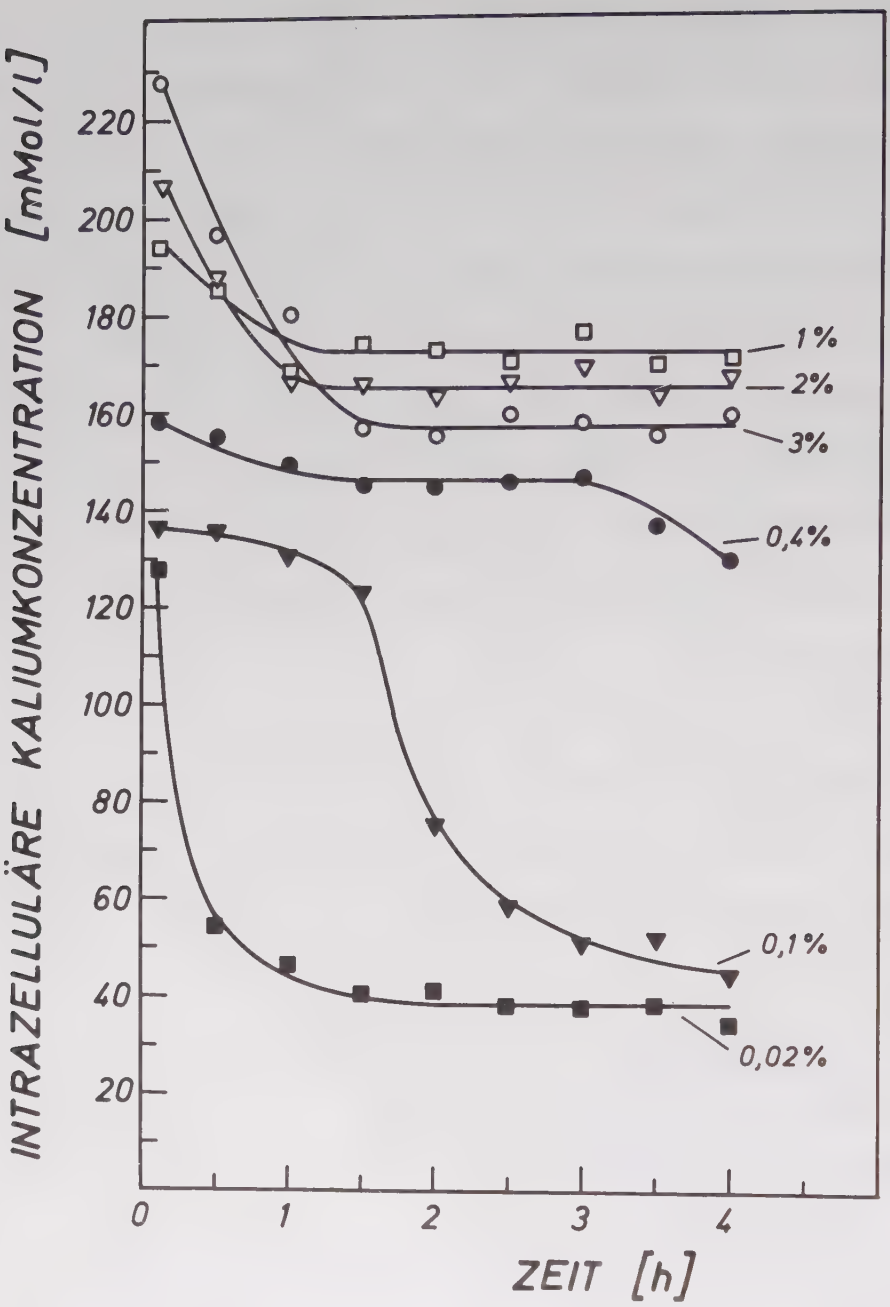

Abb. 10: Einfluß der Glucose-Außenkonzentration (0,02, 0,1 , 0,4 , 1 , 2 und 3 %) auf die zeitliche intrazelluläre Kaliumkonzentration bei E. coli B 525 bei Anwesenheit von Histidin/Leucin (je 100 mg/l) im Inkubationsmedium.

Die eingezeichneten Werte sind Mittelwerte aus zwei Meßreihen mit je zwei Meßwerten.

3.1.2 Spezifität des Histidin/Leucin-Effektes auf die Kaliumkonzentration in der Zelle

In einer Reihe weiterer Experimente wurde die Spezifität von Histidin und Leucin auf die Kaliumretention in Zellen von B 525 geprüft, indem Histidin und Leucin durch andere Aminosäuren oder chemisch ähnliche Verbindungen ersetzt wurden (29).

Die Aminosäurekombination Histidin und Leucin scheint nach Abb. 11 sehr spezifisch die Kaliuminnenkonzentration zu beeinflussen, da Norleucin, Isoleucin und Valin in Verbindung mit Histidin den Kaliumverlust der Zellen nicht verhindern können. Jedoch ist in Medien mit Isoleucin und Histidin der Abfall der intrazellulären Kaliumkonzentration langsamer als im Kontrollmedium, das keine Aminosäuren und Ammoniumchlorid enthält.

Auch im Medium, das 17 Aminosäuren mit Ausnahme von Histidin und Leucin enthielt, wird die stationäre Endkonzentration der Phase III nicht erreicht, wodurch die Spezifität der beiden Aminosäuren Histidin/Leucin besonders signifikant wird (Abb. 11).

Die asymmetrische Kaliumverteilung zwischen B 525-Zellen und Außenmedium wird ebenfalls nicht durch Ersatz von Histidin durch Imidazol stabilisiert. Da jedoch der Kaliumverlust in Gegenwart von Leucin und Imidazol stark verzögert ist, dürfte die stabilisierende Wirkung von Histidin auf die Kaliumkonzentration in den Zellen zum Teil durch die Imidazol-Gruppe bedingt sein.

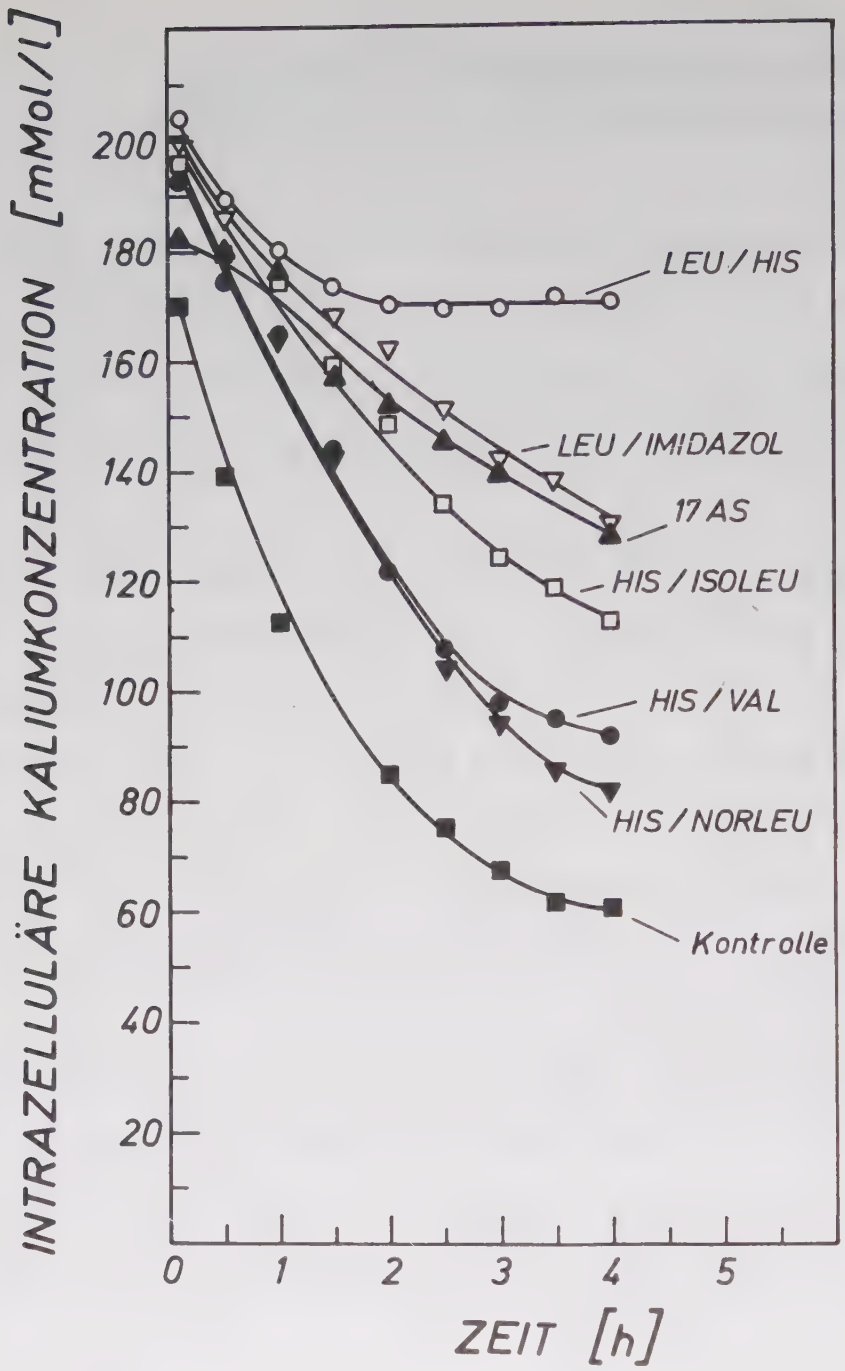

Abb. 11: Effekt von Leucin/Histidin, Leucin/Imidazol, Histidin/Isoleucin, Histidin/Valin, Histidin/Norleucin (je 100 mg/l) und einer Mischung von weiteren 17 Aminosäuren (17 AS) (je 20 mg/l) auf die intrazelluläre Kaliumkonzentration bei E. coli B 525. Glucosekonzentration im Medium: 1%. Die Aminosäuren haben L-Konfiguration. Als Kontrolle diente ein aminosäurefreier Ansatz. Die eingezeichneten Werte sind Mittelwerte aus 2 Meßreihen mit je 2 Meßwerten.

Die Regulation der Kaliuminnenkonzentration durch Leucin scheint stereospezifisch zu sein, da D-Leucin (Abb. 12) L-Leucin nicht ersetzen kann.

Weiterhin zeigen die Experimente mit N-Acetyl-L-Leucin, daß die Aminogruppe des Leucins an der Reaktion beteiligt sein muß. Unter diesen Versuchsbedingungen wurd die acetylierte Aminogruppe nicht hydrolysiert, da Bakterien in Nährmedien, die anstelle von Leucin die acetylierte Verbindung enthielten, nicht wuchsen.

Allerdings kann die fehlende Wirkung von einigen dieser Aminosäurekombinationen auch auf einer zu geringen Permeation der betreffenden Aminosäuren durch die Zellmembran beruhen.

Der Effekt von Histidin und Leucin wie auch die verzögerte Kaliumabnahme, die bei einigen anderen Aminosäurekombinationen zu beobachten sind, läßt sich wahrscheinlich nicht durch unterschiedliches Freisetzen von Ammoniumionen infolge Desaminierung der Aminosäuren erklären. Ammonium übt erst bei wesentlich höheren Konzentrationen eine stabilisierende Wirkung auf die Kaliuminnenkonzentration aus (Abb. 3).

Die optimale Stabilisierung der intrazellulären Kaliumkonzentration wird nach Abbildungen 3 und 9 durch Konzentrationen an Ammonium und Histidin/Leucin erzielt, die auch nach LUBIN und GÜNTHER das Wachstum der Bakterien am stärksten begünstigen. Wir untersuchten deshalb die Atmung der Bakterien in Abwesenheit und in Gegenwart dieser Substanzen und anderer Aminosäuren.

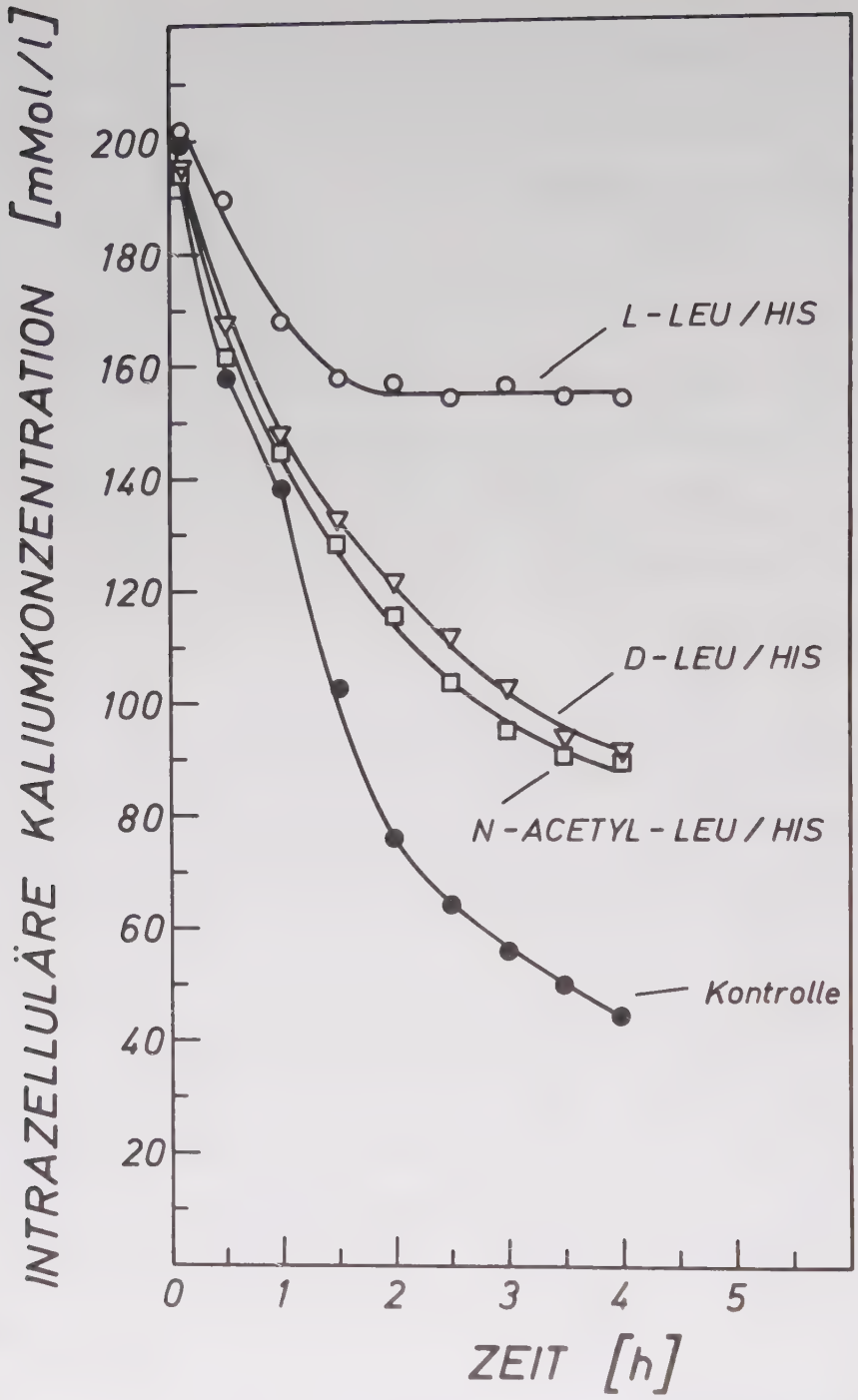

Abb. 12: Einfluß von L-Leucin/L-Histidin, D-Leucin/L-Histidin und N-Acetyl-L-Leucin/L-Histidin (je 100 mg/l) auf die intrazelluläre Kaliumkonzentration bei E. coli B 525. Die Glucosekonzentration im Medium war 1 %. Die Kontrolle enthielt keine Aminosäuren.
Die eingezeichneten Werte sind Mittelwerte aus 2 Meßreihen mit je 2 Meßwerten.

Verbindungen		O_2 - Verbrauch $\frac{\mu l\ O_2}{mg\ Feuchtgew. \cdot h}$		Glucose Verbrauch $\frac{\mu g\ Glucose}{mg\ Feuchtgew. \cdot h}$	
		B 525	B 163	B 525	B163
Kontrolle		37,9	33,3	103,7	83,3
Histidin / Leucin	100mg/l	58,3	56,2	187,7	106,1
Leucin / Imidazol	"	55,4	55,6	163,5	97,5
Histidin / Isoleucin	"	55,8	55,6	186,6	89,0
Histidin / Valin	"	53,0	55,6	172,1	93,3
Histidin / Norleucin	"	54,8	54,8	148,5	95,5
Asparaginsäure / Histidin	"	58,6	55,9	163,4	98,6
Glutaminsäure / Histidin	"	57,2	56,1	164,4	93,4
Amoniumchlorid	20mMol/l	59,5	55,7	156,0	101,1

Tab. 1: Einfluß von Aminosäuren, Imidazol bzw. Ammoniumchlorid auf den Sauerstoff- und Glucoseverbrauch bei E. coli B 525 und B 163. Das Medium enthielt 1 % Glucose. Die Messung erfolgte über einen Zeitraum von vier Stunden.
Die Werte stellen Mittelwerte aus zwei Meßreihen dar.

Nach Tab. 1 kann eine Wirkung der Aminosäurekombination Histidin/Leucin oder von Ammonium auch nicht durch eine Steigerung des Stoffwechselumsatzes durch diese Verbindungen erklärt werden. Der Sauerstoff- und Glucoseverbrauch wird zwar angehoben, doch ist dieser Effekt unspezifisch, da andere Aminosäuren, die die Kaliuminnenkonzentration nicht beeinflussen, ebenfalls zu einer annähernd gleichen Steigerung des Verbrauchs fähig sind.

Da auch die Atmung und der Glucoseverbrauch in Gegenwart und Abwesenheit dieser Verbindungen über vier Stunden konstant bleibt, kann der Kaliumverlust nicht durch eine Verminderung des Stoffwechsels erklärt werden.

3.1.3 Einfluß von Substraten auf den intrazellulären Kaliumspiegel

In den vorangegangenen Kapiteln konnte nachgewiesen werden, daß eine stationäre Kaliumkonzentration in E. coli B 525 nur durch Zugabe von Histidin und Leucin sowie Ammoniumchlorid zum Inkubationsmedium erreicht werden kann. Histidin und Leucin reagieren simultan äußerst spezifisch und lassen sich in ihrer Wirkung nicht durch andere Aminosäuren ersetzen.

Im folgenden prüften wir, wie weit die Ursache für die Kaliumabnahme in Zellen von E. coli B 525 und die Stabilisierung der Kaliumkonzentration durch die genannten Verbindungen durch das Substrat im Medium bedingt sind (29).

In aminosäurefreien Medien, die anstelle von Glucose Lactose, Galactose bzw. Fructose enthielten (Abb.13 und 14), wird ein analoger Verlauf der intrazellulären Kaliumkonzentration beobachtet. Die Abnahme der intrazellulären Kaliumkonzentration ist ebenfalls von der Substratkonzentration im Inkubationsmedium abhängig, wie es am Beispiel von Lactose in Abb.13 gezeigt wird. Eine Stabilisierung der Kaliumkonzentration in der Phase III wird nur durch Histidin und Leucin sowie Ammonium erreicht. Der stationäre Kaliumlevel in Phase III liegt ebenso hoch wie in Glucose-Medien.

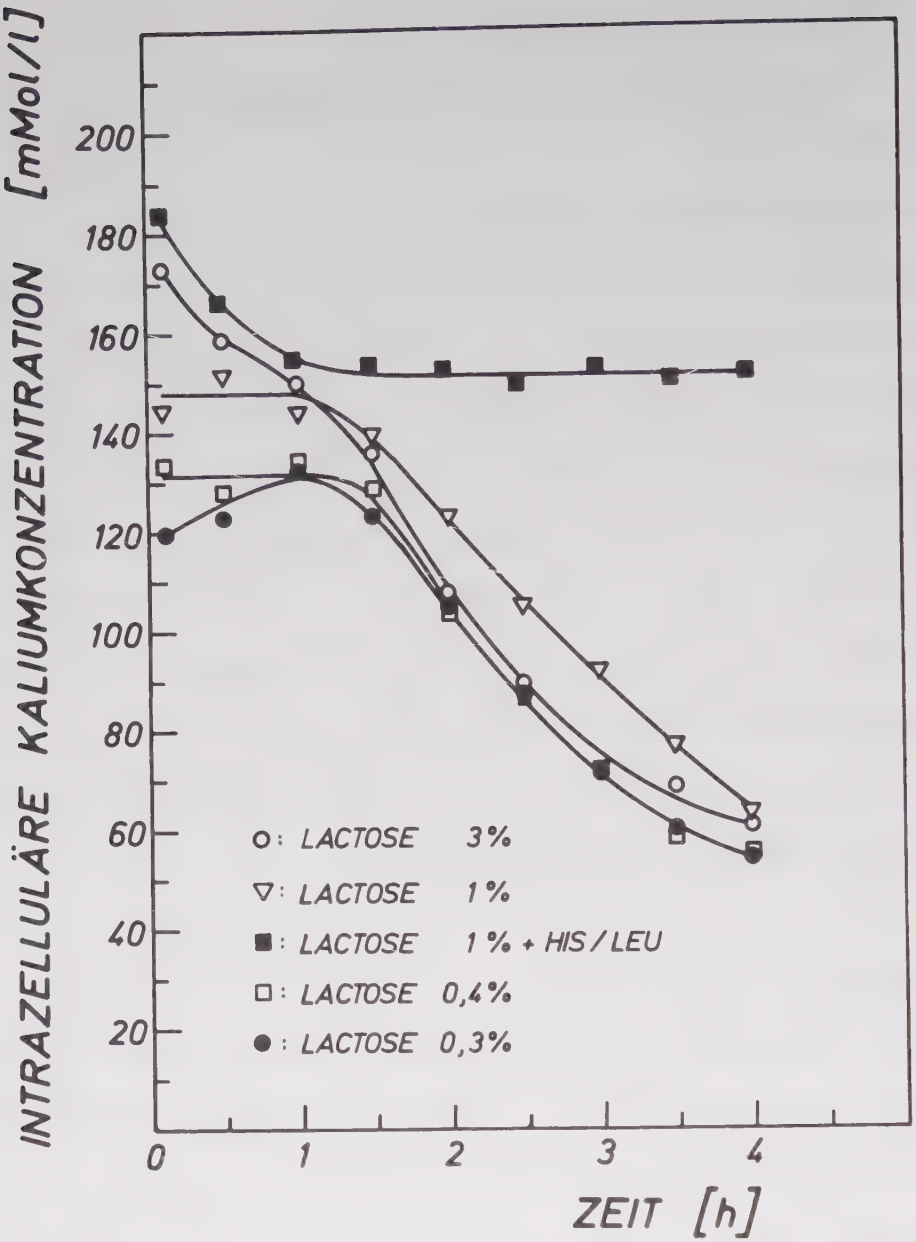

Abb. 13: Zeitlicher Verlauf der intrazellulären Kaliumkonzentration bei E. coli B 525 in aminosäurefreiem Medium in Gegenwart verschiedener Lactose-Konzentrationen (0,3 , 0,4 , 1 und 3 %). In einem zusätzlichen Experiment wurden zum Medium mit 1 % Lactose die Aminosäuren Histidin/Leucin (je 100 mg/l) hinzugefügt. Die eingezeichnten Werte sind Mittelwerte aus zwei Meßreihen mit je zwei Meßwerten.

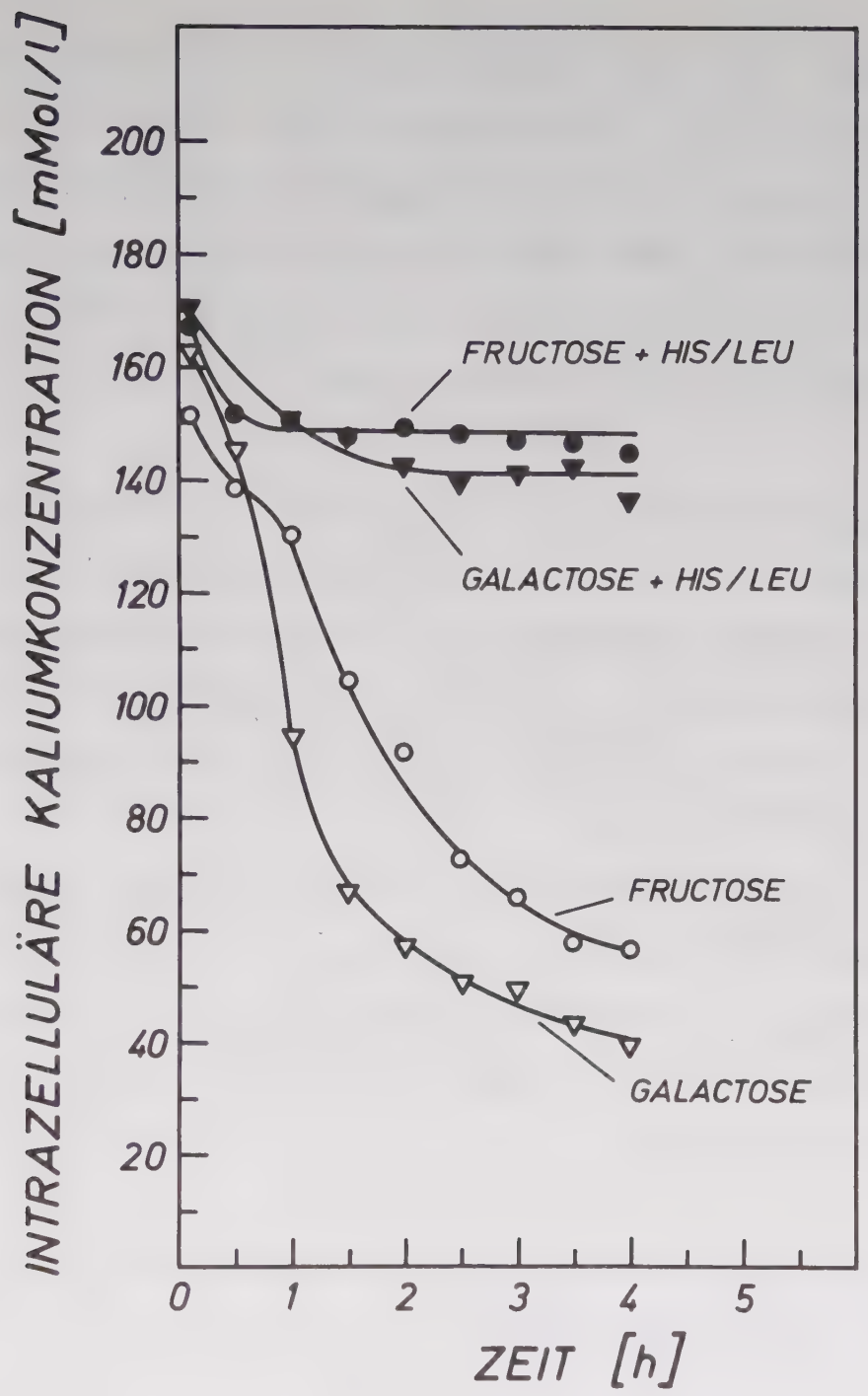

Abb.14: Zeitlicher Verlauf der intrazellulären Kaliumkonzentration bei E. coli B 525 im Medium mit 1 % Fructose bzw. 1 % Galactose in Gegenwart und Abwesenheit von Histidin/Leucin (je 100 mg/l).
Die eingezeichneten Werte sind Mittelwerte aus zwei Meßreihen mit je zwei Meßwerten.

Ersetzt man Glucose im Inkubationsmedium durch den dreiwertigen Alkohol Glycerin, so erreichen Zellen von E. coli B 525, wenn sie in lactosehaltigem Nährmedium gezüchtet wurden, eine intrazelluläre Kaliumkonzentration von nur ca. 40 mMol/l, die sich auch durch Histidin/Leucin nicht erhöhen läßt (Abb. 15). Dieser Kaliumlevel ist sofort konstant.

Die Kaliumakkumulation kann aber auf 80 - 90 mMol/l gesteigert werden, wenn die Mutante E. coli B 525 in Nährmedien mit Glycerin als Substrat gewachsen ist. Diese Kaliumkonzentration, die sich wenige Minuten nach Zugabe von Glycerin zur Suspension einstellt, bleibt über einen Zeitraum von vier Stunden konstant.

Bei vielen Versuchen wurde zunächst nach Inkubationsbeginn eine etwas höhere intrazelluläre Kaliumkonzentration (etwa 110 mMol/l) gemessen, die aber innerhalb von ca. 30 Minuten auf den Level von 80 - 90 mMol/l absank und bei diesem Wert über vier Stunden konstant blieb.

Histidin und Leucin heben den stationären Kaliumspiegel in Medien mit 1 % Glycerin nur um etwa 10 mMol/l an.

Eine weitere Erhöhung der Kaliuminnenkonzentration läßt sich auch nicht durch mehrmaliges Umzüchten auf Glycerin-Agar erzielen. Ebensowenig konnte die intrazelluläre Kaliumkonzentration durch höhere Glycerin-Konzentrationen im Inkubationsmedium gesteigert werden. Im gesamten untersuchten Konzentrationsbereich von 0,4 - 10 % Glycerin blieb der Kaliumlevel zwischen 80 und 100 mMol/l konstant.

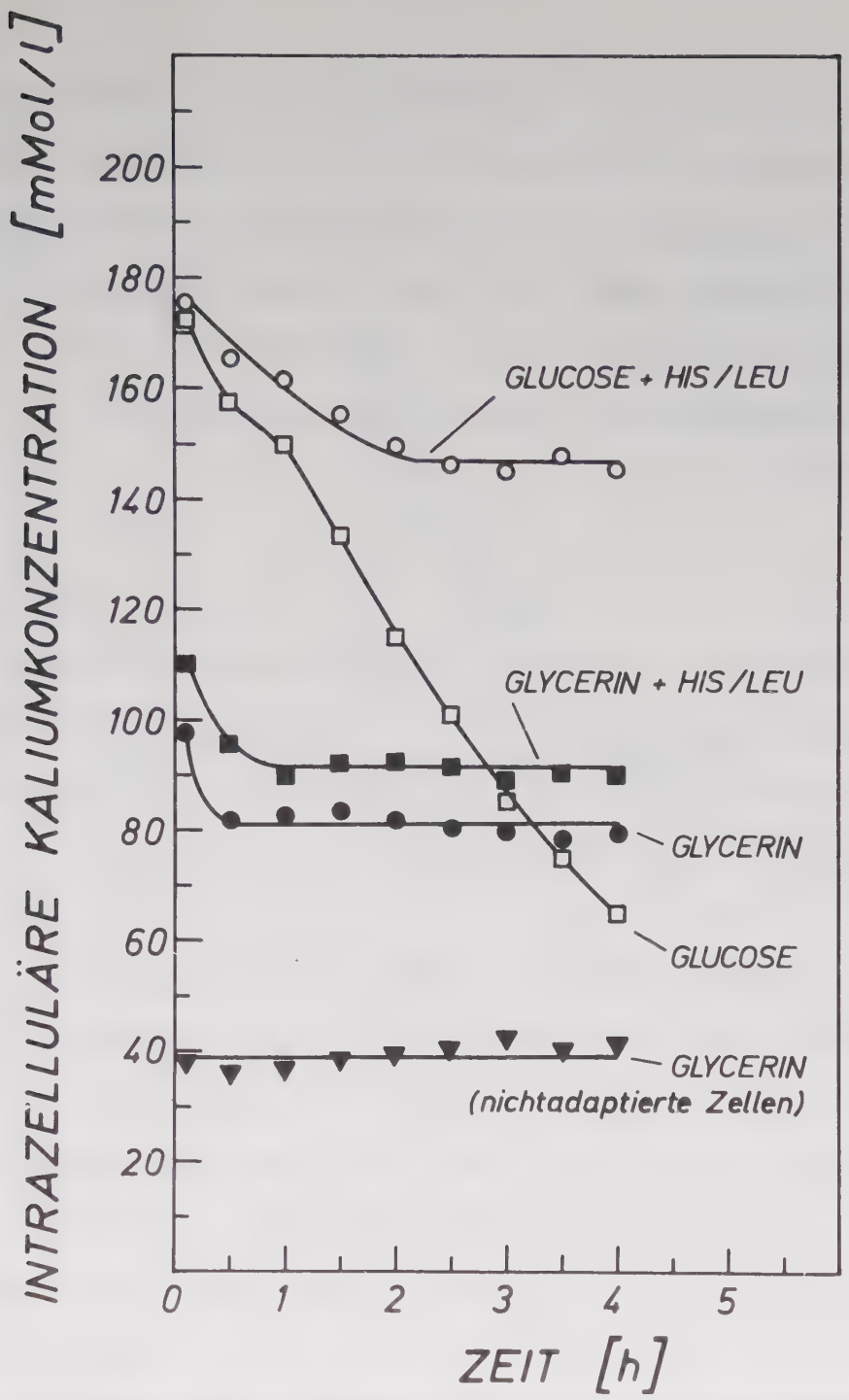

Abb.15: Intrazelluläre Kaliumkonzentration als Funktion der Zeit bei Glycerin-adaptierten E. coli B 525-Zellen nach Inkubation in Medien mit 1 % Glycerin, 1 % Glycerin und Histidin/Leucin (je 100 mg/l), 1 % Glucose bzw. 1 % Glucose und Histidin/Leucin (je 100 mg/l). Vergleichsmessung nichtadaptierter E. coli B 525-Zellen in Medien mit 1 % Glycerin.
Die eingezeichneten Werte sind Mittelwerte aus vier bzw. zwei Meßreihen mit je zwei Meßwerten.

Bietet man aber Glycerin-adaptierten E. coli B 525-Zellen anstelle von Glycerin Glucose als Substrat im Inkubationsmedium an, so tritt der typische Zeitverlauf der Kaliuminnenkonzentration wieder auf (Abb. 15). Unter diesen experimentellen Bedingungen läßt sich eine stabile stationäre Kaliuminnenkonzentration auch wieder nur durch Zugabe von Histidin und Leucin erreichen.

Da der Abbau von Glycerin über Glycerinphosphat erfolgt und dementsprechend die intrazelluläre Hexose-6-phosphat-Konzentration sehr niedrig ist, könnte möglicherweise der Kaliumspiegel in der Phase II und III durch die freien oder phosphorylierten Zucker reguliert werden.

Zur Prüfung dieser Hyopthese wurden die Bakterien in glycerinhaltigem Nährmedium gezüchtet und in Inkubationsmedien übertragen, die 1 % Glycerin, aber nicht die beiden Aminosäuren Histidin und Leucin enthielten. Nach 90 Minuten Vorinkubation wurden zu aliquoten Anteilen dieser Medien jeweils einer der genannten Zucker, die alle D-Konfiguration hatten, bzw. zum Vergleich Zucker, wie z. B. Glucose, Galactose oder L-Arabinose, die von beiden Stämmen als Substrat zum Wachstum verwertet werden können, hinzugegeben. Die Konzentration an Zucker betrug jeweils 1 %.

Die intrazelluläre Kaliumkonzentration von E. coli B 525 steigt, wenn Glucose, Galactose, Fructose oder Arabinose dem Medium hinzugegeben werden, annähernd auf einen Level, wie er auch in Medien ohne Glycerin gefunden wird (Abb. 16). Im Verlauf von drei bis vier Stunden sinkt aber der Kaliumgehalt der Bakte-

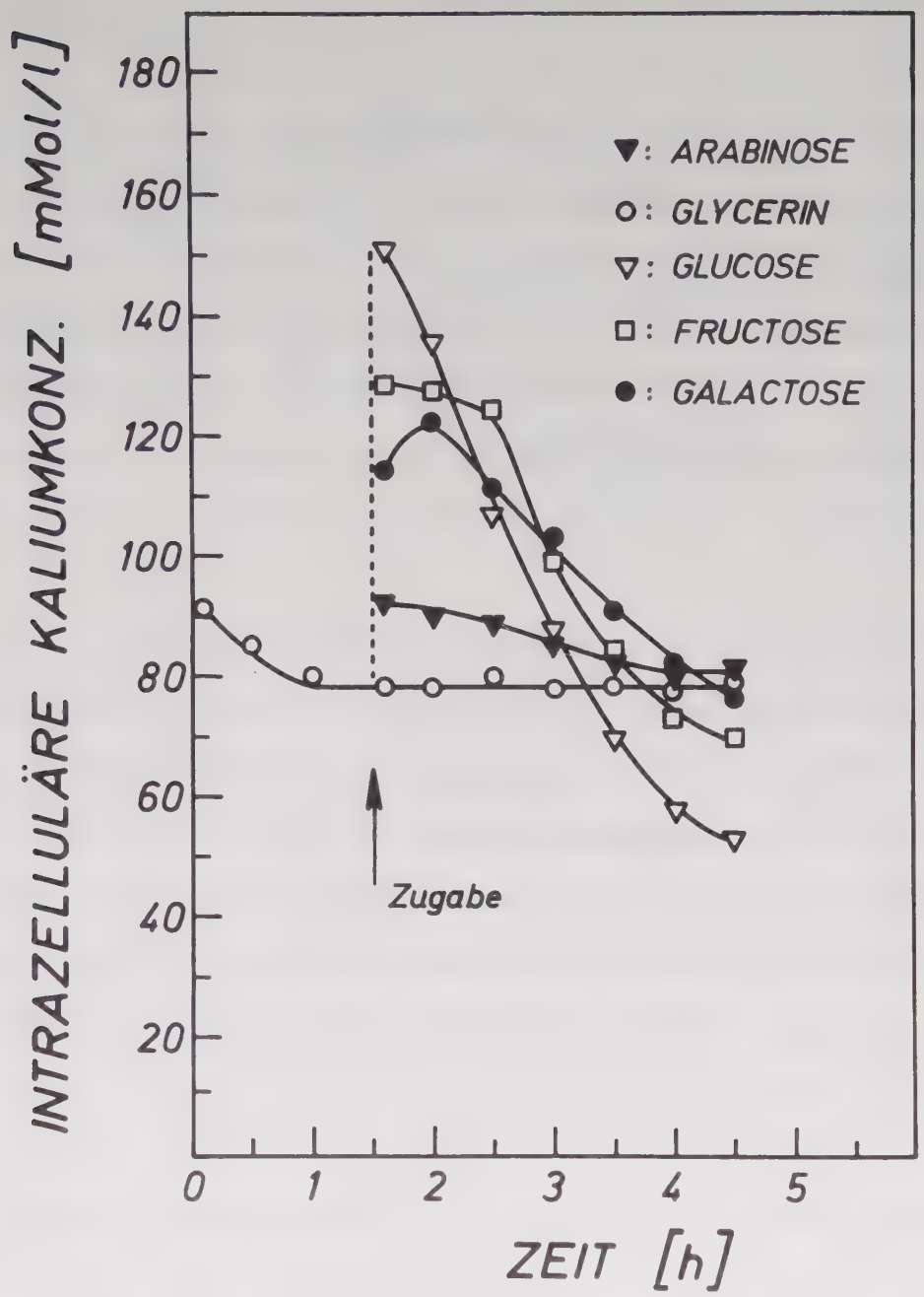

Abb. 16: Effekt von Arabinose, Glucose, Fructose bzw. Galactose (je 1 %) auf die intrazelluläre Kaliumkonzentration bei Glycerin-adaptierten E. coli B 525-Zellen nach 1,5-stündiger Vorinkubation im Medium mit 1 % Glycerin.

Die eingezeichneten Werte sind Mittelwerte aus zwei Meßreihen mit je zwei Meßwerten.

rien wieder auf ca. 60 mMol/1 ab.

Im Vergleich dazu zeigen Saccharose, Raffinose und Xylose keinen Effekt auf die intrazelluläre Kaliumkonzentration. Wahrscheinlich permeieren Saccharose und Raffinose unter den Versuchsbedingungen nicht in die Zellen von B 525. Dagegen zeigten Versuche mit Xylose-C-14, daß Xylose von B525 aufgenommen wird. Radiochromatographische Untersuchungen ergaben, daß über 90% der Aktivität in der Zelle als freie Xylose vorliegt.

Ribose, die von B 525 und B 163 nicht als Substrat zum Wachsen verwertet werden kann, führt dagegen zu einem steilen Abfall der Kaliuminnenkonzentration auf etwa 50 mMol/1 (Abb. 17). Die Höhe der Kaliumabnahme hängt von der Ribose-Konzentration ab. Die Abnahme ist nach Zugabe von 100 mMol/1 (etwa 1,5 %) Ribose am größten und beträgt bei 1 mMol/1 Ribose nur noch etwa 10 mMol/1 Kalium. Dieser Kaliumabfall kann durch Histidin und Leucin kompensiert werden.

Allerdings zeigten vorläufige radiochromatographische Untersuchungen über die Aufnahme von Ribose-C-14, daß etwa 30 % der aufgenommenen Aktivität in die RNS eingebaut wird. Der Hauptanteil der Radioaktivität nach der Ribose-C-14-Aufnahme wurde in einer Substanz nachgewiesen, die bisher noch nicht identifiziert werden konnte. Ein Einbau der Aktivität in Zwischenprodukte des glycolytischen Abbauweges konnte jedoch ausgeschlossen werden.

Auch 2-Deoxyglucose und α-Methylglucosid (Abb. 17) stören die

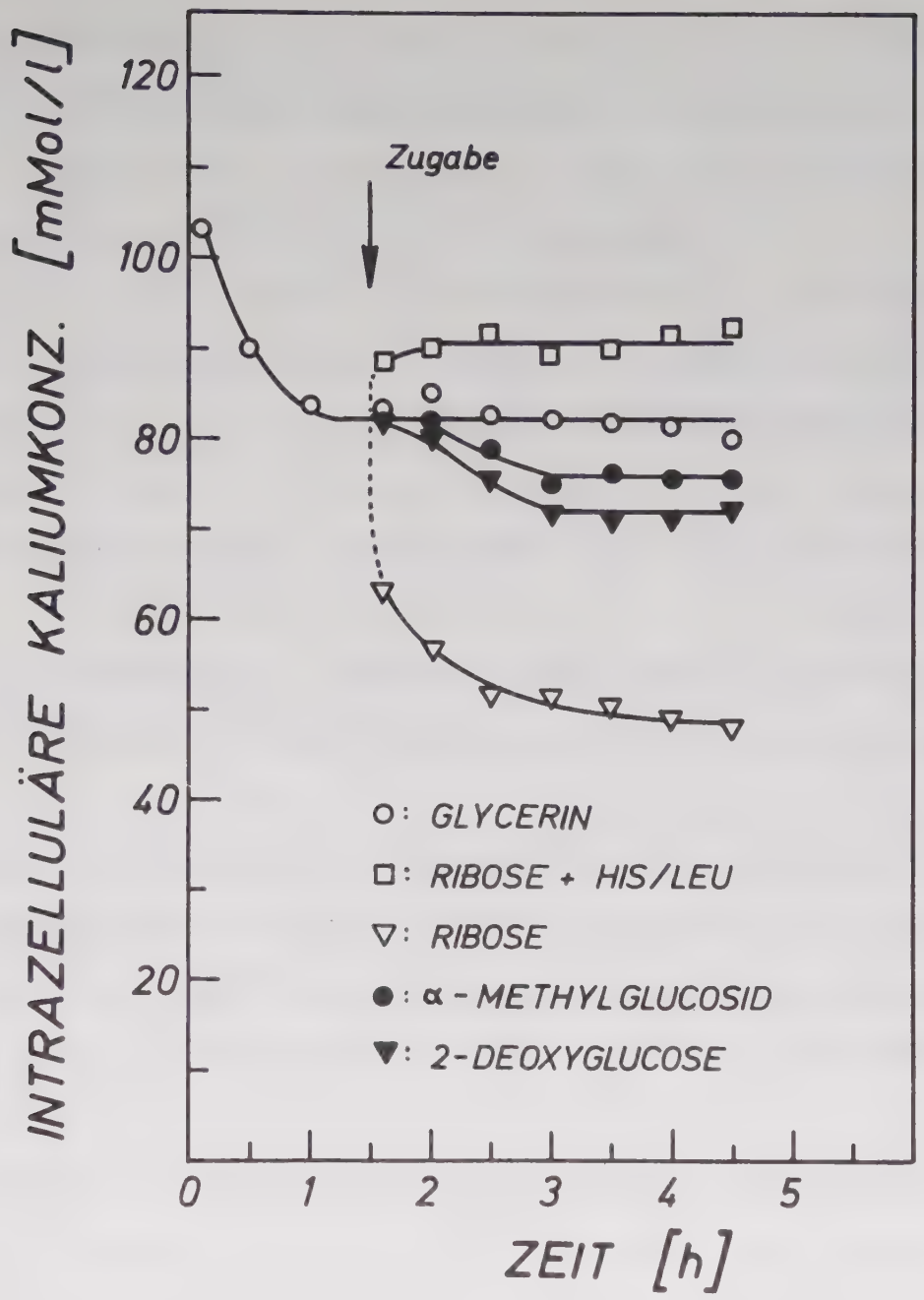

Abb. 17: Effekt von Ribose (1 %), Ribose (1 %) und Histidin/Leucin (je 100 mg/l), α-Methylglucosid bzw. 2-Deoxyglucose (je 1 %) auf die intrazelluläre Kaliumkonzentration bei Glycerin-adaptierten E. coli B 525-Zellen nach 1,5-stündiger Vorinkubation in Medien mit Glycerin (1 %).

Die eingezeichneten Werte sind Mittelwerte aus vier Meßreihen mit je zwei Meßwerten.

stationäre Kaliumverteilung der Bakterien in glycerinhaltigen Medien. Die Abnahme ist jedoch geringer und kaum konzentrationsabhängig.

2-Deoxyglucose und α-Methylglucosid liegen in der Zelle als freie oder phosphorylierte Zucker vor. Sie können im Stoffwechsel nicht weiter umgesetzt werden.

Weitere Hinweise für eine regulierende Rolle der Zucker oder Zuckerphosphate auf den Kaliumspiegel in den Zellen von B 525 lassen sich durch Experimente erhalten, in denen die intrazellulären Konzentrationen dieser Verbindungen gesenkt werden.

Es ist bekannt, daß die Konzentration von Hexose-Phosphaten unter anaeroben Bedingungen und unter aeroben Bedingungen durch Ammonium (s.w.u.) und bei machen biologischen Objekten (30) durch Erhöhung der Phosphatkonzentration gesenkt werden kann.

Die stabilisierende Wirkung von Ammonium auf den Kaliumgehalt wurde schon oben aufgezeigt (Abb. 3).

Deshalb untersuchten wir den Einfluß verschiedener Phosphatkonzentrationen auf den zeitlichen Verlauf der intrazellulären Kaliumkonzentration.

Für hohe Phosphatkonzentrationen wurde der Tris-Puffer des Inkubationsmediums anstatt durch Salzsäure mit Phosphorsäure neutralisiert. Die Natriumaußenkonzentration und die Osmolalität wurden konstant gehalten.

Zur Einstellung niedriger Phosphatkonzentrationen wurde die Konzentration der beiden Natriumphosphate im Medium auf ein Fünftel gesenkt und zur Erhaltung der Natriumaußenkonzentration Natriumchlorid (80 mMol/l) hinzugefügt.

Aus über 10 Messungen ergab sich keine Änderung des Kaliumabfalls bei Variierung der Phosphatkonzentration zwischen 12 mMol/l und 120 mMol/l. In Übereinstimmung hiermit wurde - im Unterschied zu Messungen von HOLZER (30) - die Atmung kaum erhöht.
Unter anaeroben Bedingungen, d.h. unter Begasung der Suspension mit Stickstoff, tritt dagegen eine erhebliche Änderung des zeitlichen Verlaufs der Kaliuminnenkonzentration auf (Abb. 18). Obgleich das Medium unter diesen Bedingungen weder Histidin/Leucin noch Ammoniumchlorid enthält, wird bei E. coli B 525 nach etwa zwei Stunden ein stationärer Kaliumlevel erreicht, der über weitere zwei Stunden konstant bleibt.

Dieser stationäre Kaliumlevel in der Phase III liegt bei 120 mMol/l und entspricht damit in etwa dem Wert, der sich in Medien mit 40 mMol/l Ammonium unter aeroben Bedingungen einstellt (Abb. 3).

Durch Zugabe von Histidin und Leucin wird die Kaliuminnenkonzentration ebenfalls angehoben und erreicht einen Wert von etwa 160 mMol/l.

Da eine Reihe der oben genannten Experimente die Hypothese stützen, daß der Kaliumverlust der Zellen durch intrazel-

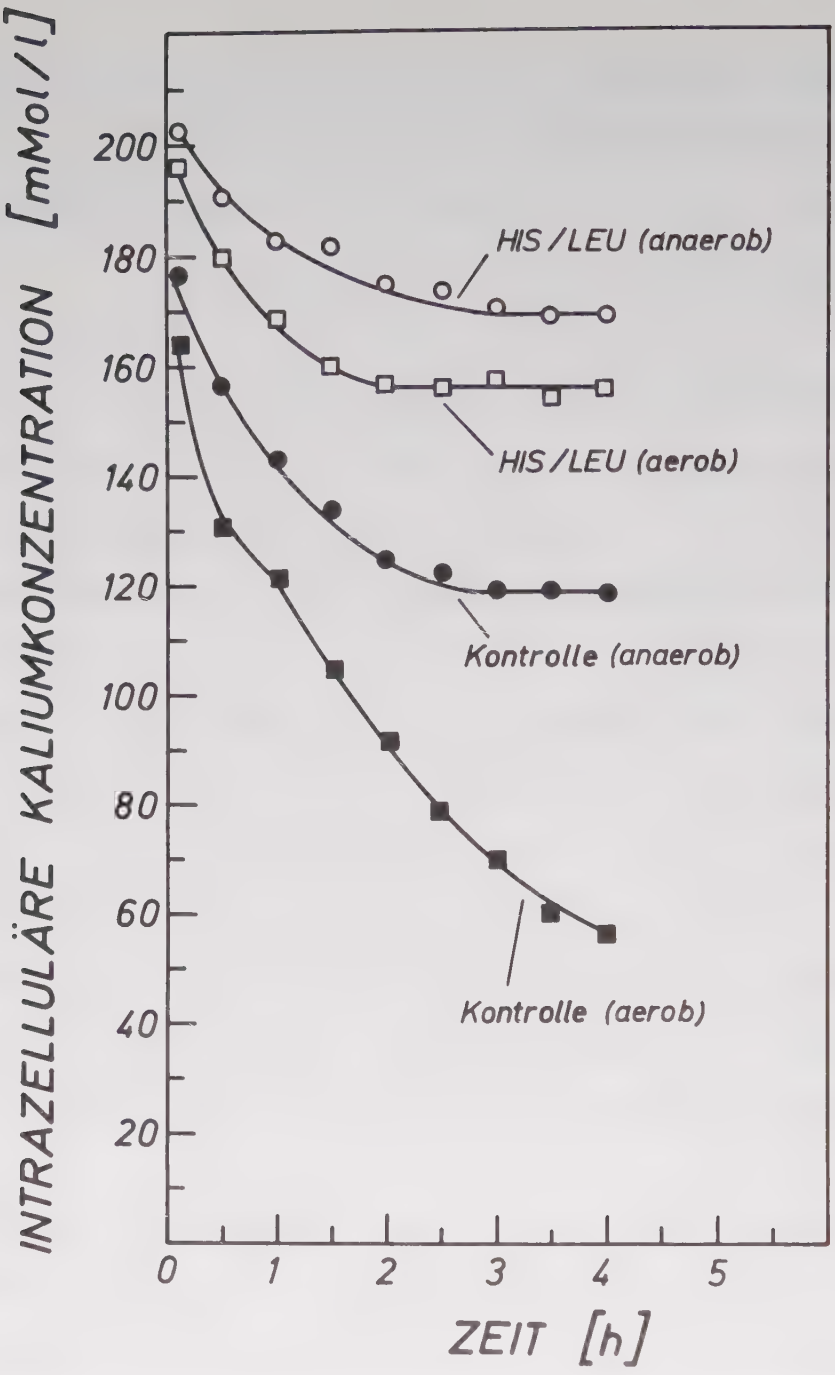

Abb. 18: Einfluß aerober bzw. anaerober Bedingungen auf den zeitlichen Verlauf der intrazellulären Kaliumkonzentration bei E. coli B 525 bei Inkubation in Medien mit 1 % Glucose bzw. 1 % Glucose und je 100 mg/l Histidin/Leucin.

Die eingezeichneten Werte sind Mittelwerte aus vier Meßreihen mit je zwei Meßwerten.

luläre Hexosen bzw. Hexosephosphate ausgelöst wird, wurde die intrazelluläre Glucose-6-Phosphat-Konzentration unter verschiedenen experimentellen Bedingungen enzymatisch untersucht.

Ammonium senkt, wie vermutet, den Glucose-6-Phosphat-Spiegel in B 525 um etwa 40 %. Eine leichte Abnahme von 10 % ist ebenfalls bei Zugabe von Histidin/Leucin, aber auch bei anderen Aminosäuren zu beobachten, die keinen stabilisierenden Einfluß auf die Kaliumretention ausüben.

Verbindungen		Glucose-6-phosphat $\frac{\mu Mol}{g\ Trockengewicht}$	
		B 525	B 163
Kontrolle		12,9	12,4
Histidin/Leucin	100 mg/l	11,4	9,2
Asparaginsäure	"	11,9	
Glutaminsäure	"	11,7	
Ammoniumchlorid	20 mMol/l	7,1	8,2

Tab. 2: Einfluß von Aminosäuren bzw. Ammoniumchlorid auf die intrazelluläre Glucose-6-phosphat-Konzentration bei E. coli B 525 und B 163. Die Medien enthielten 1% Glucose. Die Messung erfolgte über einen Zeitraum von zwei Stunden.
Die Werte stellen Mittelwerte aus zwei Meßreihen dar. Der Standardfehler des Mittelwertes beträgt $\pm$ 10%.

3.2 bei E. coli B 163

Wie Vergleichsmessungen am Wildtyp B 163 zeigen, müssen die Ergebnisse, die durch Messungen an der Mutante B 525 erhalten wurden, zu einem großen Teil der Mutation zugeschrieben werden.

In Abb. 19 sind Messungen der zeitlichen intrazellulären Kaliumkonzentration bei variabler Glucosekonzentration im Außenmedium für den Wildtyp E. coli B 163 in Abwesenheit von Ammonium und Histidin/Leucin wiedergegeben.

Bei Glucosekonzentration über 0,3 % wird nach zwei Stunden im Unterschied zur Kaliummangelmutante B 525 ein stationärer Kaliumlevel erreicht. Sein Wert liegt tiefer als er direkt nach Inkubationsbeginn in den Zellen gemessen wird. Diese Kaliuminnenkonzentration wird von E. coli B 163 über die Versuchsdauer von vier Stunden konstant gehalten.

Bei sehr geringen Glucosekonzentrationen fällt dagegen auch bei E. coli B 163 die intrazelluläre Kaliumkonzentration nach etwa zwei Stunden ab. Diese Abnahme ist wie bei E. coli B 525 energetisch bedingt, da zum Zeitpunkt der Kaliumabnahme keine Glucose mehr im Medium nachgewiesen werden konnte.

Auch in Medien, die anstelle von Glucose 1 % Fructose, Galactose oder Lactose als Substrat enthielten, wird ein stationärer Zustand nach zwei Stunden erreicht. Der Kaliumlevel liegt bei etwa 200 mMol/l.

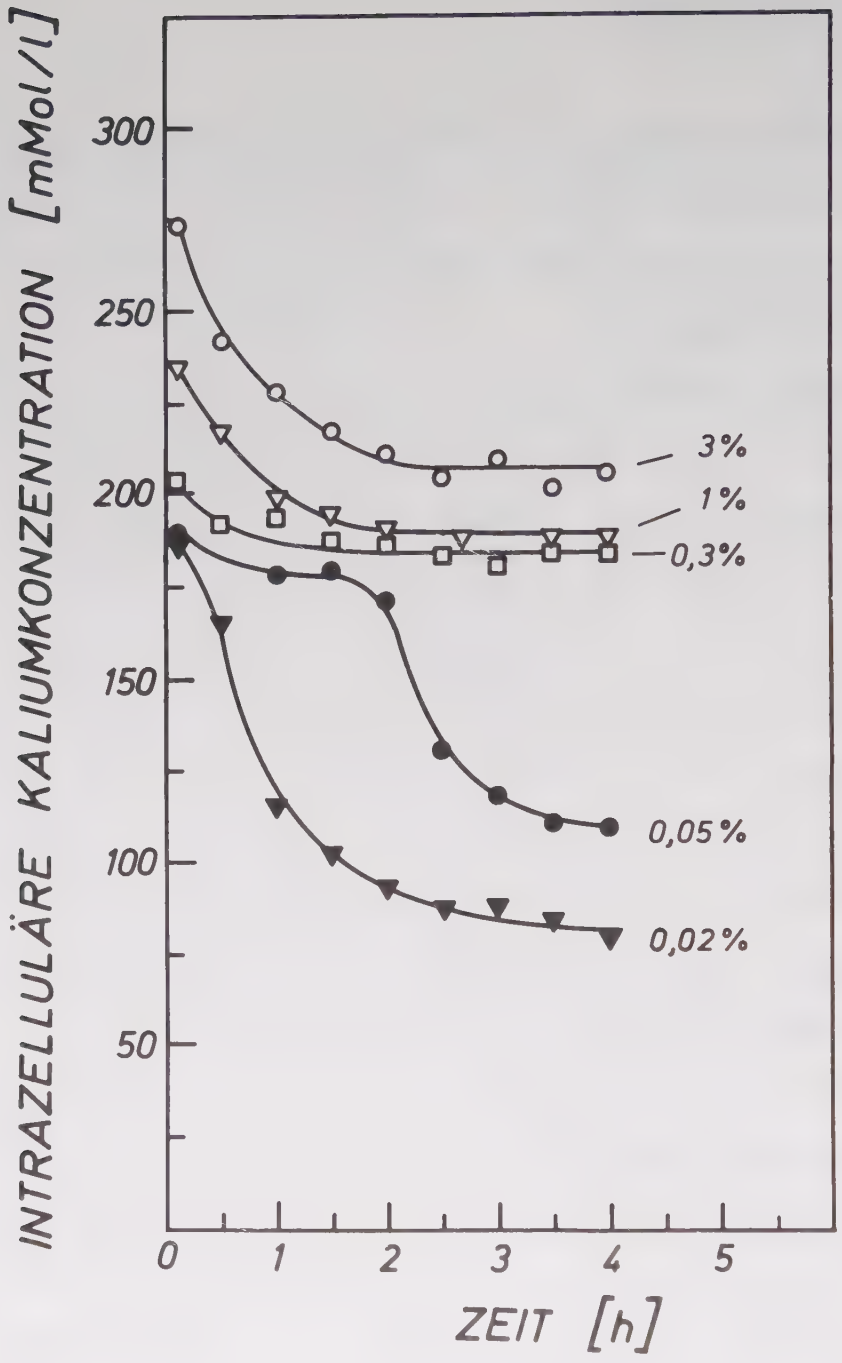

Abb. 19: Intrazelluläre Kaliumkonzentration bei E. coli B 163 in aminosäurefreien Medien bei verschiedenen Glucosekonzentrationen (0,02 , 0,05, 0,3 , 1 bzw. 3 %).

Die eingezeichneten Werte sind Mittelwerte aus zwei Meßreihen mit je zwei Meßwerten.

Die Wirkung von Histidin und Leucin sowie von Ammonium auf die stationäre Kaliumverteilung beim Wildtyp B 163 ist wesentlich schwächer ausgeprägt als bei der Mutante, sie ist aber vorhanden, so daß sie bei kinetischen Messungen zu berücksichtigen ist. 100 mg/l Histidin/Leucin heben z.B. den stationären Kaliumlevel bei 1 % Glucose im Außenmedium um etwa 30 % an. Die in aminosäurefreien Medien zu beobachtende anfängliche Kaliumabnahme unterbleibt unter diesen Bedingungen völlig (Abb. 20).

Bakterien, die in lactosehaltigem Nährmedium gewachsen und in Medien mit Glycerin als Substrat inkubiert worden sind, erreichen ebenfalls spätestens nach 30 Minuten eine Kaliuminnenkonzentration von 190 mMol/l, die über mehrere Stunden stabil ist (Abb. 21). Im Unterschied zur Mutante B 525 ist ein vorheriges Adaptieren der Bakterien in glycerinhaltigen Nährmedien nicht notwendig. Gibt man analog zu den Versuchsbedingungen der Abb. 16 und Abb. 17 nach 90 Minuten die bei E. coli B 525 untersuchten Zucker zum Inkubationsmedium, so wird nur in Gegenwart von 1 % Glucose die Kaliuminnenkonzentration leicht angehoben (Abb. 21).
Zucker, die - wie Ribose bei B 525 - eine sehr schnelle Kaliumabnahme hervorrufen, senken die stationäre Kaliuminnenkonzentration von B 163-Zellen, die in Medien mit Glycerin inkubiert worden sind, nicht.

Enzymatische Bestimmungen des Glucose-6-Phosphat-Spiegels in den Zellen von B 163 in Gegenwart von Ammonium und Aminosäuren zeigen allerdings keine Unterschiede zu den Ergebnissen, die für B 525 gefunden wurden.

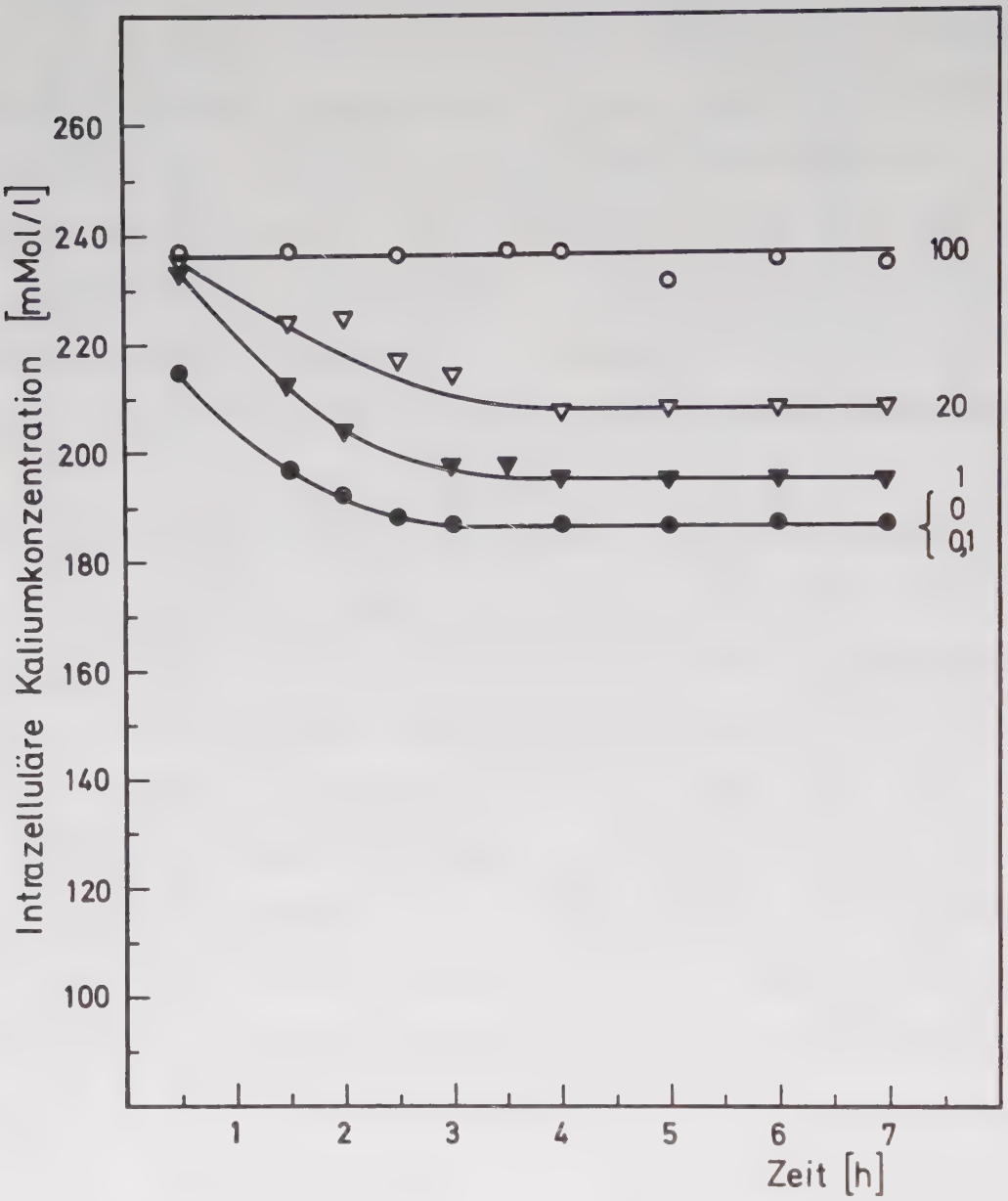

Abb. 20: Intrazelluläre Kaliumkonzentration bei E. coli B 163 als Funktion der Zeit bei Inkubation in Medien mit 1 % Glucose, die zusätzlich steigende Histidin- und Leucinkonzentrationen (0 - 100 mg/l) enthalten. Die eingezeichneten Werte sind Werte von zwei Meßreihen mit je einem Meßwert.

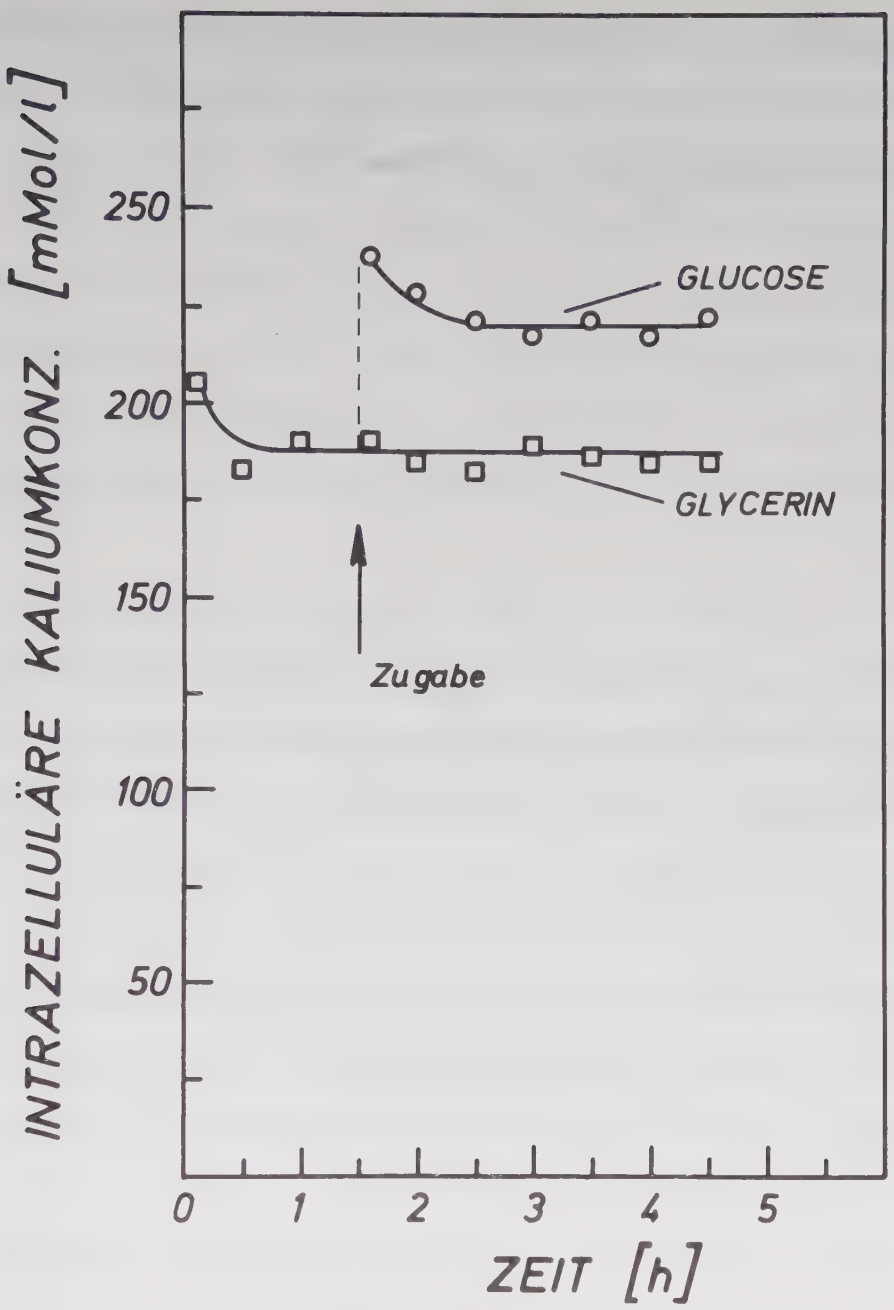

Abb. 21: Effekt von Glucose (1 %) auf den zeitlichen Verlauf der intrazellulären Kaliumkonzentration bei E. coli B 163 nach 1,5-stündiger Vorinkubation in Medien mit Glycerin (1 %).
Die eingezeichneten Werte sind Mittelwerte aus zwei Meßreihen mit je zwei Meßwerten.

4. ABHÄNGIGKEIT DER INTRAZELLULÄREN KALIUMKONZENTRATION VON DER EXTRAZELLULÄREN KALIUMKONZENTRATION IM STATIONÄREN ZUSTAND BEI E. COLI B 525

Wie die Untersuchungen zur Einstellung und Stabilität der stationären Kaliumverteilung bei E. coli B 525 erbracht haben, stellt sich bei der Mutante eine über mehrere Stunden stabile intrazelluläre Kaliumkonzentration unter folgenden Bedingungen ein:

a) In Medien mit Glucose als Substrat und unter aeroben Bedingungen zwei Stunden nach der Inkubation, und zwar nur in Anwesenheit von Ammoniumchlorid oder Histidin und Leucin.

b) In Medien mit Glycerin als Substrat unter aeroben Bedingungen. Die intrazelluläre Kaliumkonzentration ist sofort konstant, jedoch ist sie um den Faktor zwei niedriger.

c) In Medien mit Glucose als Substrat und unter anaeroben Bedigungen zwei Stunden nach der Inkubation.

Die Messung der stationären Kaliumverteilung wurde unter aeroben Bedingungen mit Glucose als Substrat in Anwesenheit von Histidin und Leucin durchgeführt, um die Ergebnisse mit den Messungen von GÜNTHER vergleichen zu können (31).

Die Inkubationsdauer bei 37 °C nach Glucosezugabe betrug 2 - 3 Stunden.

4.1 Abhängigkeit in Medien mit verschiedener Osmolalität

Für die Bestimmung der Kaliumkonzentration im Zellinnern von E. coli B 525 in Abhängigkeit von der extrazellulären Kaliumkonzentration wurde im Medium, das je 100 mg/l Histidin und Leucin enthielt, die Kaliumkonzentration im Bereich von 0,2 mMol/l bis 25 mMol/l bei Konstanthaltung der Konzentrationen aller übrigen Komponenten variiert.

Die unter diesen Bedingungen auftretende Zunahme der Osmolalität des Inkubationsmediums beträgt, wenn man das Medium mit 0,2 mMol/l Kalium als Bezugssystem wählt, maximal 15 %. Die Messungen der Kaliumverteilung an E. coli B 525 im Natrium-Medium A nach DAVIS, das zusätzlich je 100 mg/l Histidin und Leucin und die entsprechenden Mengen Kaliumchlorid enthielt, und dessen Osmolalität um etwa die Hälfte geringer ist als die des in dieser Arbeit benutzten Mediums, ergaben vergleichbare intrazelluläre Kaliumkonzentrationen (s.u.).

Die intrazelluläre Kaliumkonzentration bei E. coli B 525 scheint demnach in nicht so starkem Maße wie bei E. coli K 12 (32) von der Osmolalität des Inkubationsmediums abzuhängen. Um aber völlig sicher eine Verschiebung der intrazellulären Kaliumkonzentration durch Osmolalitätsänderung im Außenmedium auszuschließen, wurde ein Teil der Kaliumbestimmungen in Medien, denen zusätzlich 50 mMol/l Saccharose zugesetzt worden war, durchgeführt.

Ein sukzessiver Austausch von Natrium gegen Kalium, wie er von LUBIN bei E. coli B 207 durchgeführt worden ist, dürfte dagegen zu nicht überschaubaren Änderungen der intrazellulären Kaliumkonzentration führen, da Messungen von GÜNTHER eine Abhängigkeit der intrazellulären Kaliumkonzentration von der Natriumkonzentration im Medium gezeigt haben.

Für die Messung der intrazellulären Kaliumkonzentration in Abhängigkeit von der extrazellulären Kaliumkonzentration wurde zusätzlich der Kaliumgehalt des Mediums nach der Inkubation gemessen. Da die Suspensionsdichte mit 0,2 g Feuchtgewicht/100 ml Inkubationsmedium so gewählt wurde, daß oberhalb von 1 mMol/l extrazellulärer Kaliumkonzentration trotz Aufnahme durch die Bakterien nur eine vernachlässigbar kleine Änderung der extrazellulären Kaliumkonzentration auftritt, so ist eine Verschiebung im Bereich sehr niedriger Kalium-Außenkonzentrationen zu erwarten. Die extrazellulären Kaliumkonzentrationen wurden deshalb nach den Messungen entsprechend korrigiert.

In Abb. 22 ist die Kaliuminnenkonzentration von E. coli B 525 im stationären Zustand gegen die Kaliumaußenkonzentration unter verschiedenen Außenbedingungen aufgetragen. Die Kurve (a) gibt die Verteilung im Medium mit einer Natriumkonzentration von 100 mMol/l, (b) im Natrium-Medium A wieder. Beide Medien enthalten je 100 mg/l Histidin und Leucin.

Wie man der Abbildung entnimmt, ist der Verlauf der Kaliuminnenkonzentration in Abhängigkeit von der Außenkonzentration trotz unterschiedlicher Osmolalität praktisch identisch.

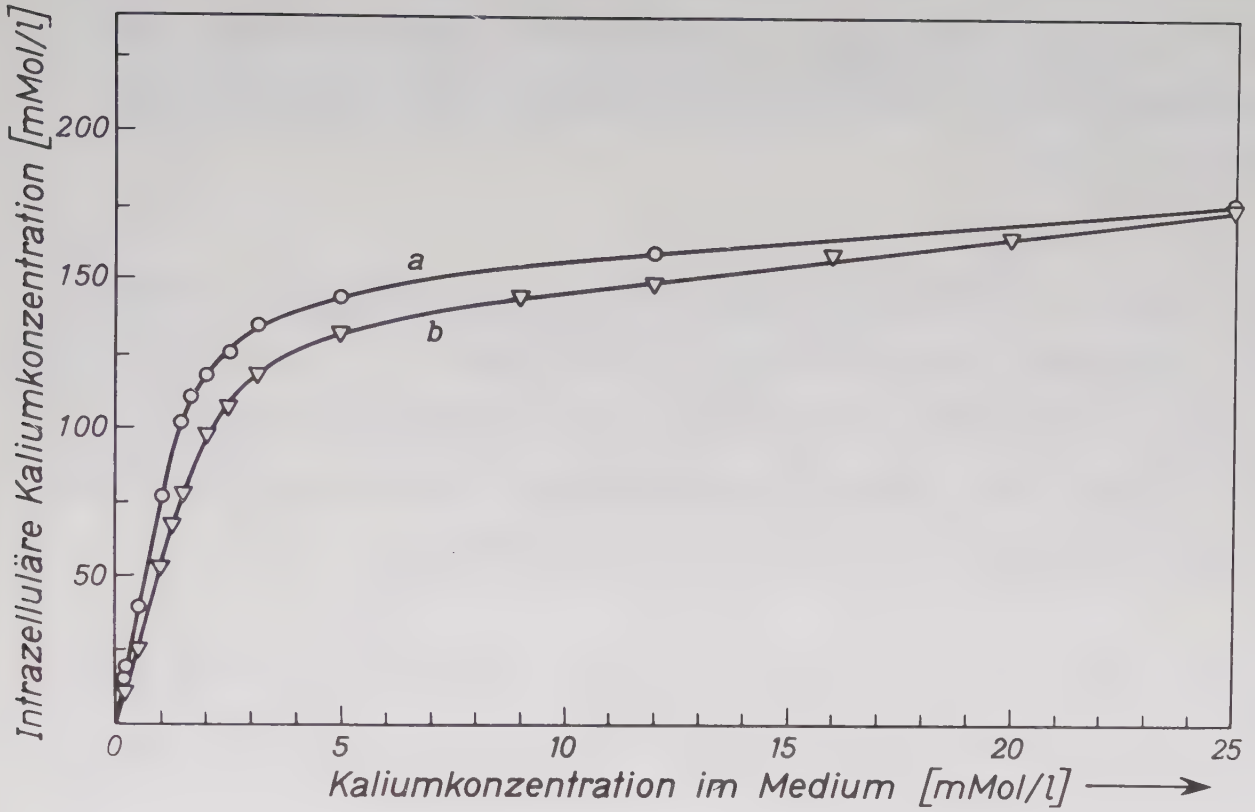

Abb. 22: Intrazelluläre Kaliumkonzentration bei E. coli B 525 als Funktion der extrazellulären Kaliumkonzentration bei Inkubation in Medien mit zunehmener Kaliumkonzentration (0,2 - 25 mMol/l).

a) Medium mit einer Natriumkonzentration von 100 mMol/l, Histidin und Leucin je 100 mg/l und Glucose 1 %.

b) Natrium-Medium A nach DAVIS mit Histidin und Leucin je 100 mg/l und Glucose 1 %.

Die Zugabe von 50 mMol/l Saccharose zum Inkubationsmedium, die eine Änderung in der Osmolalität entsprechend einer Erhöhung der Kaliumkonzentration um 25 mMol/l im Medium bewirkt, hat überhaupt keinen Einfluß. Die Meßwerte liegen innerhalb der Fehlergrenze.

In Abb. 23 ist das Konzentrationsverhältnis $[K]_a/[K]_i$ gegen $[K]_a$ nach den Werten der Kurve (a) der Abb. 22 , in Abb. 24 $1/[K]_i$ gegen $1/[K]_a$ aufgetragen. Diese Auftragung entspricht der in Abb. 23 , nur daß in diesem Fall der Bereich der niedrigen Außenkonzentration stärker gedehnt wird.

Die in den graphischen Darstellungen eingezeichneten Werte für die Kaliumverteilungen stellen einen Mittelwert aus 5 Meßreihen mit je 5 Meßwerten dar. Der Fehler dieser Mittelwerte beträgt für niedrige Kaliumaußenkonzentrationen $\pm$ 4 % und verringert sich mit zunehmender Kaliumaußenkonzentration.

Bei Kaliumaußenkonzentrationen unterhalb von etwa 1,2 mMol/l ist das Konzentrationsverhältnis konstant, während im Konzentrationsbereich von 1,2 mMol/l bis 25 mMol/l ein linearer Zusammenhang zwischen dem Konzentrationsverhältnis und der Kaliumaußenkonzentration besteht. Man muß deshalb annehmen, daß sich bei 1,2 mMol/l Kaliumaußenkonzentration die Transportkinetik ändert.

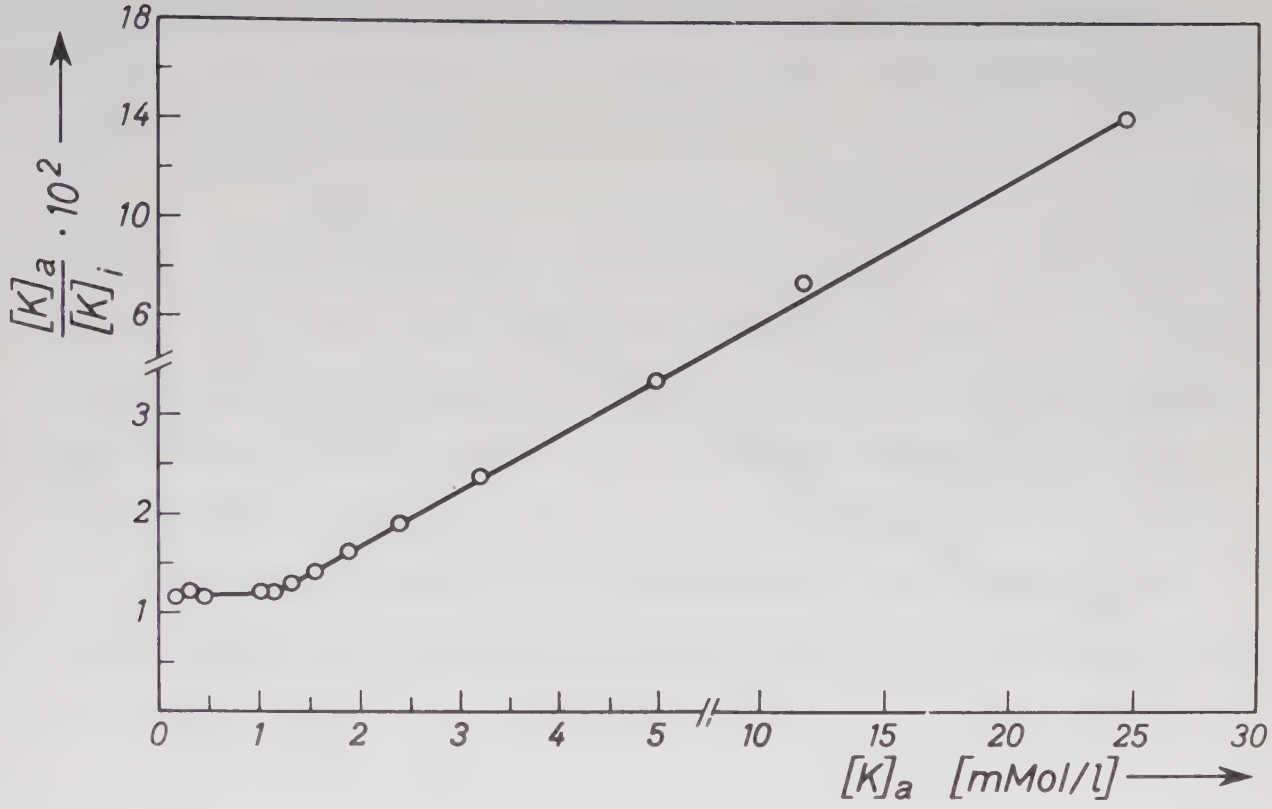

Abb.23: Abhängigkeit des Verhältnisses der extrazellulären und intrazellulären Kaliumkonzentration von der extrazellulären Kaliumkonzentration. Für die Darstellung wurden die Meßwerte der Kurve a der Abb. 22 verwendet.

$[K]_i$ = intrazelluläre Kaliumkonzentration

$[K]_a$ = extrazelluläre Kaliumkonzentration

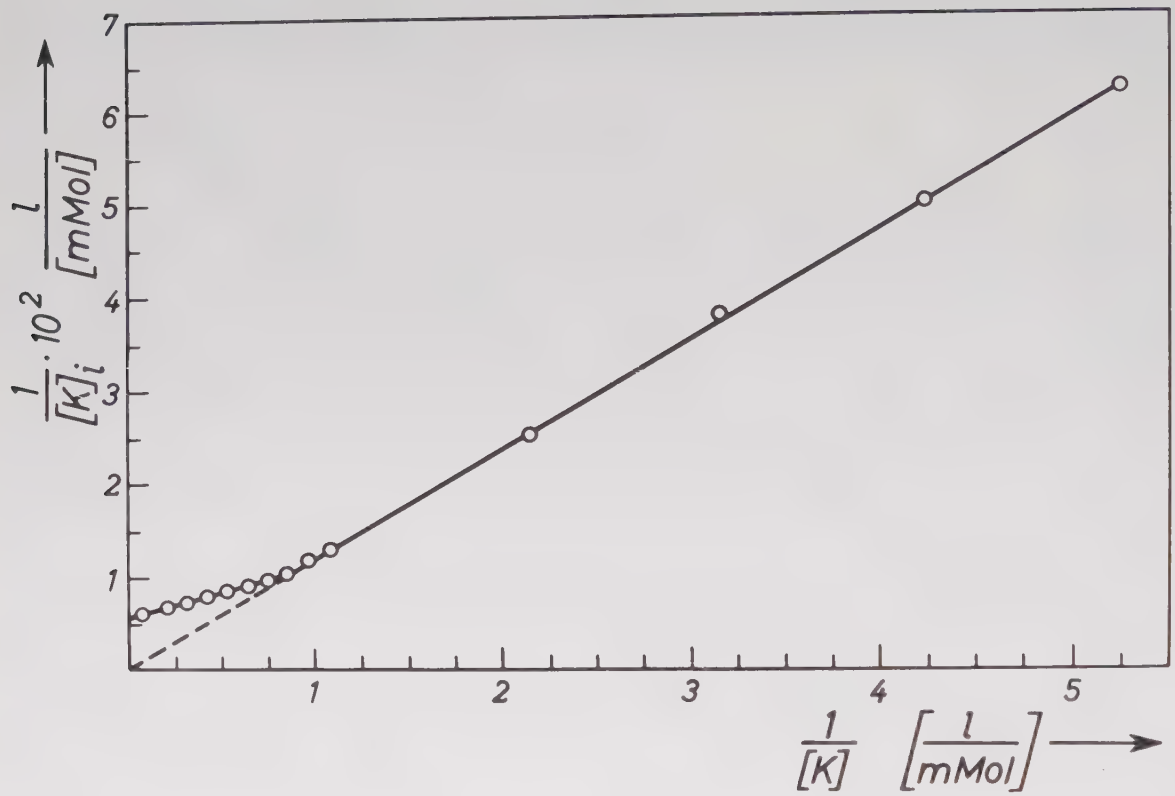

Abb. 24: Abhängigkeit der reziproken intrazellulären Kaliumkonzentration von der reziproken extrazellulären Kaliumkonzentration. Für die Darstellung wurden die Meßwerte der Abb. 22 (Kurve a) verwendet.

Um Aufschluß über den Kaliumtransportmechanismus in beiden Konzentrationsbereichen zu gewinnen, prüften wir deshalb im folgenden, ob das konstante Kaliumkonzentrationsverhältnis in Form einer Donnanverteilung interpretiert werden kann, und wie weit Natrium, das Hauptkation des Außenmediums, den Transport des Kaliums beeinflußt.

SCHULTZ, WILSON, EPSTEIN (33) schlossen bei E. coli K 12 aus der Tatsache, daß das Verhältnis der intrazellulären und extrazellulären Chloridkonzentration bei Änderung der extrazellulären Chloridkonzentration über weite Bereiche konstant blieb, auf eine passive Verteilung dieser Ionen und berechneten für Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase eine Membranpotentialdifferenz von - 29 mV, für Zellen aus der stationären Wachstumsphase - 3 mV.

Der Tabelle 3 entnimmt man, daß auch bei E. coli B 525 das Chloridverhältnis zwischen Zellinnerem und Außenmedium im Bereich von 0,2 mMol/l bis 25 mMol/l Chloridaußenkonzentration innerhalb einer Fehlergrenze von $\pm$ 4 % konstant ist. Das Membranpotential würde sich hiernach zu - 17 mV ergeben.

Die Bestimmung der Kaliumverteilung in Abwesenheit von Glucose (bei Kaliumaußenkonzentrationen von 1, 6, 12 und 25 mMol/l) ergab in guter Übereinstimmung mit der Chloridverteilung den Wert von 0,49 $\pm$ 0,03. Da sich Kalium in Abwesenheit von Glucose passiv verteilen sollte, darf der Wert von - 17 mV für das Membranpotential als richtig angesehen werden.

$[Cl]_a$ [mMol/l]	$[Cl]_i$ [mMol/l]	$\frac{[Cl]_i}{[Cl]_a}$
0,2	0,11	0,54 ± 0,01
1	0,56	0,56 ± 0,01
12	6,59	0,55 ± 0,01
25	12,10	0,48 ± 0,01
	Mittelwert:	0,53 ± 0,02

Tab. 3: Intrazelluläre Chloridkonzentration bei E. coli B 525 bei Inkubation im Natrium-Medium A nach DAVIS mit Histidin und Leucin je 100 mg/l, Glucose 1 % und zunehmender Chloridkonzentration. Die jeweiligen Chloridkonzentrationen wurden durch zusätzliche Einwaage von Kaliumchlorid eingestellt.
Die angegebenen Fehler sind Standardfehler des Mittelwertes (je vier Messungen).

Die Möglichkeit einer Donnanverteilung als Erklärung für das konstante Kaliumverhältnis im Bereich unterhalb 1,2 mMol/l Kaliumaußenkonzentration scheidet demnach aus, da sich für diesen Bereich ein Membranpotential von - 110 mV errechnet.

Gleichzeitig wurde der extrazelluläre Raum und das Trockengewicht bei verschiedenen Kaliumaußenkonzentrationen bestimmt. Der Tab. 4 entnimmt man, daß im untersuchten Bereich von 0,2 bis 25 mMol/l extrazellulärer Kaliumkonzentration keine Änderung des extrazellulären Raumes und des Trockengewichtes auftritt.

[K] im Medium [mMol/l]	Trockengewicht [%]	Extrazellulärer Raum [ml/g Feuchtgewicht]
0,2	23,2	0,28 ± 0,01
1,0	23,0	0,27 ± 0,01
12	23,0	0,26 ± 0,01
25	23,0	0,26 ± 0,01
	Mittelwert:	0,27 ± 0,01

Tab. 4: Trockengewichte und extrazellulärer Raum von E. coli B 525 nach Inkubation in Medien mit verschiedenen Kaliumkonzentrationen.
Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus vier Meßreihen.

4.2 Abhängigkeit von der Natrium- und Phosphatkonzentration

Zur Prüfung des Natriumeinflusses auf den Kaliumtransport bestimmten wir die Kaliuminnenkonzentration in Abhängigkeit von der Kaliumaußenkonzentration bei Inkubation in Medium mit einer Natriumaußenkonzentration von 20 mMol/l. Zu diesem Zweck wurde im Medium die Konzentration der beiden Natriumphosphate auf ein Fünftel verringert und zur Erhaltung der Osmolalität eine entsprechende Menge an Saccharose zum Inkubationsmedium hinzugegeben.

Um einen möglichen Einfluß der verringerten Phosphatkonzentration (12 mMol/l) auf die Kaliuminnenkonzentration zu erfassen, wurde in einem zweiten Experiment die Kaliumverteilung bei einer Natriumaußenkonzentration von 100 mMol/l untersucht. Für diese Messungen wurde dem Medium anstelle von Saccharose 80 mMol/l Natriumchlorid hinzugefügt.

Wir fanden, daß Phosphat die Kaliumverteilung nicht beeinflußt (Abb. 25). Man entnimmt jedoch der Abbildung, daß bei einer Natriumaußenkonzentration von 20 mMol/l das Verhältnis der stationären Kaliumkonzentration linear von der Kaliumaußenkonzentration über den gesamten Konzentrationsbereich abhängt.

Die Fehlergrenzen entsprechen denen, die für die Kaliumbestimmungen bei 100 mMol/l Natriumaußenkonzentration angegeben wurden. Die Kaliuminnenkonzentration ist unter diesen Bedingungen wesentlich höher - in qualitativer Übereinstimmung mit GÜNTHER.

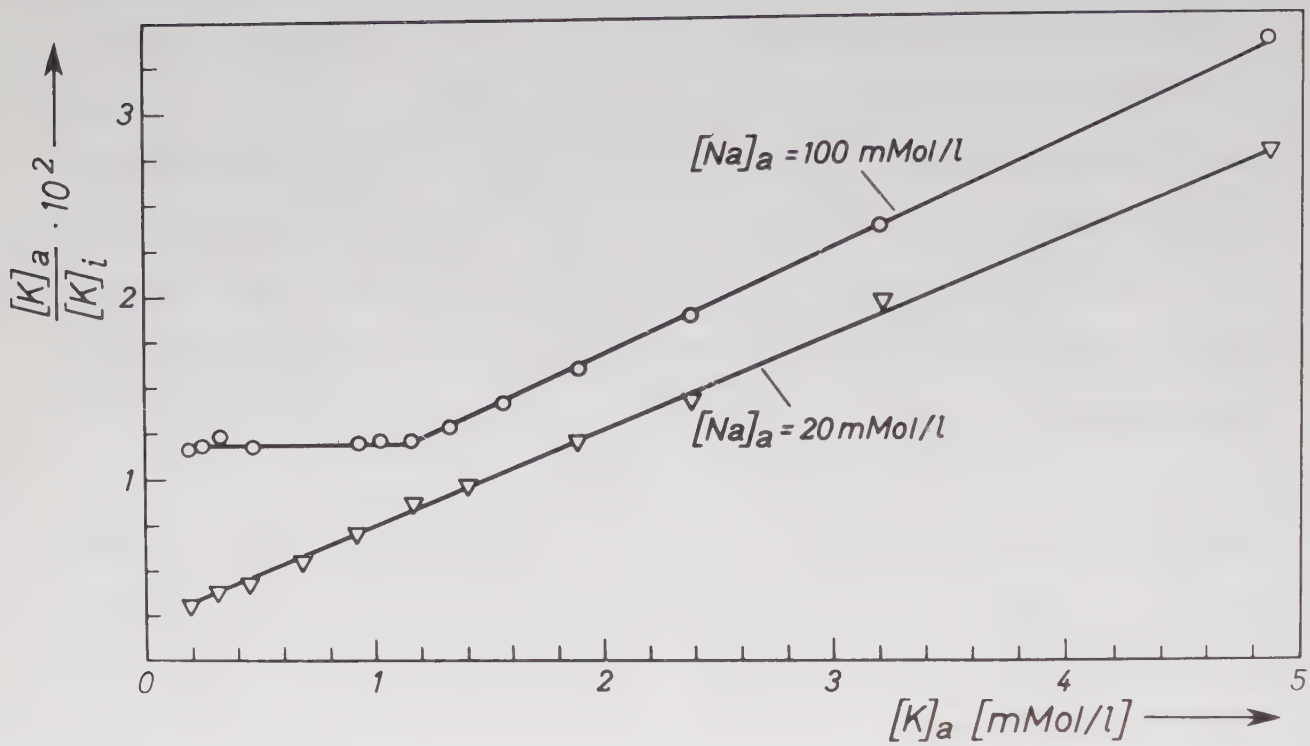

Abb. 25: Abhängigkeit des Verhältnisses der extrazellulären und der intrazellulären Kaliumkonzentration bei E. coli B 525 von der extrazellulären Kaliumkonzentration bei extrazellulären Natriumkonzentrationen von 20 mMol/l bzw. 100 mMol/l. Die Phosphatkonzentration wurde auf 12 mMol/l verringert und 160 mMol/l Saccharose bzw. 80 mMol/l Natriumchlorid hinzugefügt. Beide Medien enthielten Histidin und Leucin je 100 mg/l und Glucose 1 % .

Abb. 26 gibt die Änderung der Natriuminnenkonzentration in Abhängigkeit von der Kaliumaußenkonzentration bei 20 mMol/l und 100 mMol/l Natriumaußenkonzentration wieder. Die Natriuminnenkonzentration ist oberhalb einer Kaliumaußenkonzentration von etwa 3 mMol/l konstant. Bei Verringerung der Kaliumaußenkonzentration steigt die Natriuminnenkonzentration für beide Natriumaußenkonzentrationen in unterschiedlichem Maße an.

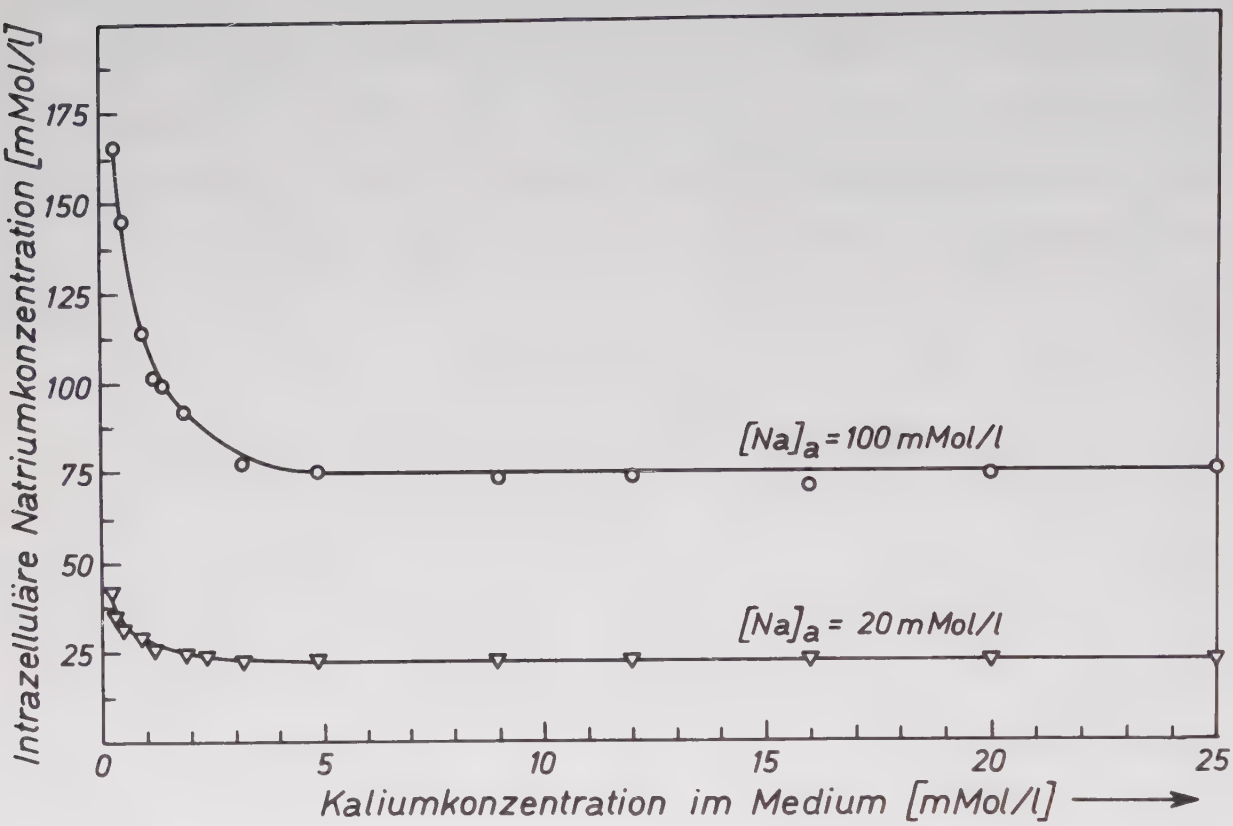

Abb. 26: Intrazelluläre Natriumkonzentration als Funktion der Kaliumkonzentration im Medium bei E. coli B 525 bei Inkubation in Medien mit zunehmender Kaliumkonzentration (0,2 - 25 mMol/l).
Zusammensetzung der Medien wie unter Abb. 25

5. UNTERSUCHUNGEN ZUR WACHSTUMSGESCHWINDIGKEIT VON E. COLI B 525

Wie die Messungen der Kaliumverteilung bei verschiedenen extrazellulären Natriumkonzentrationen gezeigt haben, stellt sich bei niedrigen Natriumaußenkonzentrationen - bei gleicher extrazellulärer Kaliumkonzentration - eine höhere intrazelluläre Kaliumkonzentration ein.

So stellt sich bei E. coli B 525 bei einer Natriumkonzentration von 20 mMol/l und einer Kaliumkonzentration von 0,3 mMol/l im Medium eine intrazelluläre Natriumkonzentration von 30 mMol/l und eine Kaliumkonzentration von 80 mMol/l ein, während bei 100 mMol/l Natriumaußenkonzentration diese intrazelluläre Kaliumkonzentration erst bei etwa 1 mMol/l extrazellulärer Kaliumkonzentration erreicht wird. Die Natriuminnenkonzentration beträgt unter diesen Bedingungen 100 mMol/l.

Wie schon LUBIN (21) und GÜNTHER gezeigt haben, hängt die Wachstumsgeschwindigkeit bei E. coli B 525 von der extrazellulären Kaliumkonzentration ab. Da aber nach LUBIN das Wachstum linear von der intrazellulären Kaliumkonzentration abhängen soll, sollte E. coli B 525 in Medien mit niedriger Natriumkonzentration bereits bei geringeren extrazellulären Kaliumkonzentrationen wachsen können. Diese Verschiebung sollte darüber hinaus noch durch die Abnahme der intrazellulären Natriumkonzentration verstärkt werden, da Untersuchungen von LUBIN im zellfreien System gezeigt haben, daß Natrium die Proteinsynthese hemmt.

Zur Überprüfung des nach LUBIN geforderten, linearen Zusammenhanges zwischen der Zahl der Verdopplungen pro Stunde n und der intrazellulären Kaliumkonzentration K_i, muß die jeweilige Konzentration in den Zellen bekannt sein. Diese läßt sich unter Wachstumsbedingungen wegen der geringen Suspensionsdichten nur schwierig erfassen. Andererseits wurde aber in Kap. 4 gezeigt, daß das Kaliumkonzentrationsverhältnis K_a/K_i bei Bakterien, die aus der stationären Wachstumsphase geerntet wurden, linear von der extrazellulären Kaliumkonzentration abhängt. Falls dieser Zusammenhang auch für Bakterien in der logarithmischen Wachstumsphase zutrifft, sollte bei einer linearen Abhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit von der intrazellulären Kaliumkonzentration der Quotient $[K]_a / n$ ebenfalls linear von der extrazellulären Kaliumkonzentration abhängen:

$$[K]_a / n = a[K]_a + b$$

$$\tau \equiv 1/n = a + b/[K]_a \qquad \text{Gl. 2}$$

In Abb. 27 ist die Wachstumsgeschwindigkeit von E. coli B 525 in Abhängigkeit von der extrazellulären Kaliumkonzentration aufgetragen. Da Tris das Wachstum hemmt, wurden die Bakterien im Natrium-Medium A inkubiert, das die drei essentiellen Aminosäuren (je 100 mg/l) und 1 % Glucose zusätzlich enthielt. Die Kaliumkonzentration wurde zwischen 0,1 - 25 mMol/l variiert. Die Natriumkonzentration betrug 117 mMol/l.

Wie die Abbildung zeigt, beginnt das Wachstum von E. coli B 525 bei einer extrazellulären Kaliumkonzentration von 0,5 mMol/l.

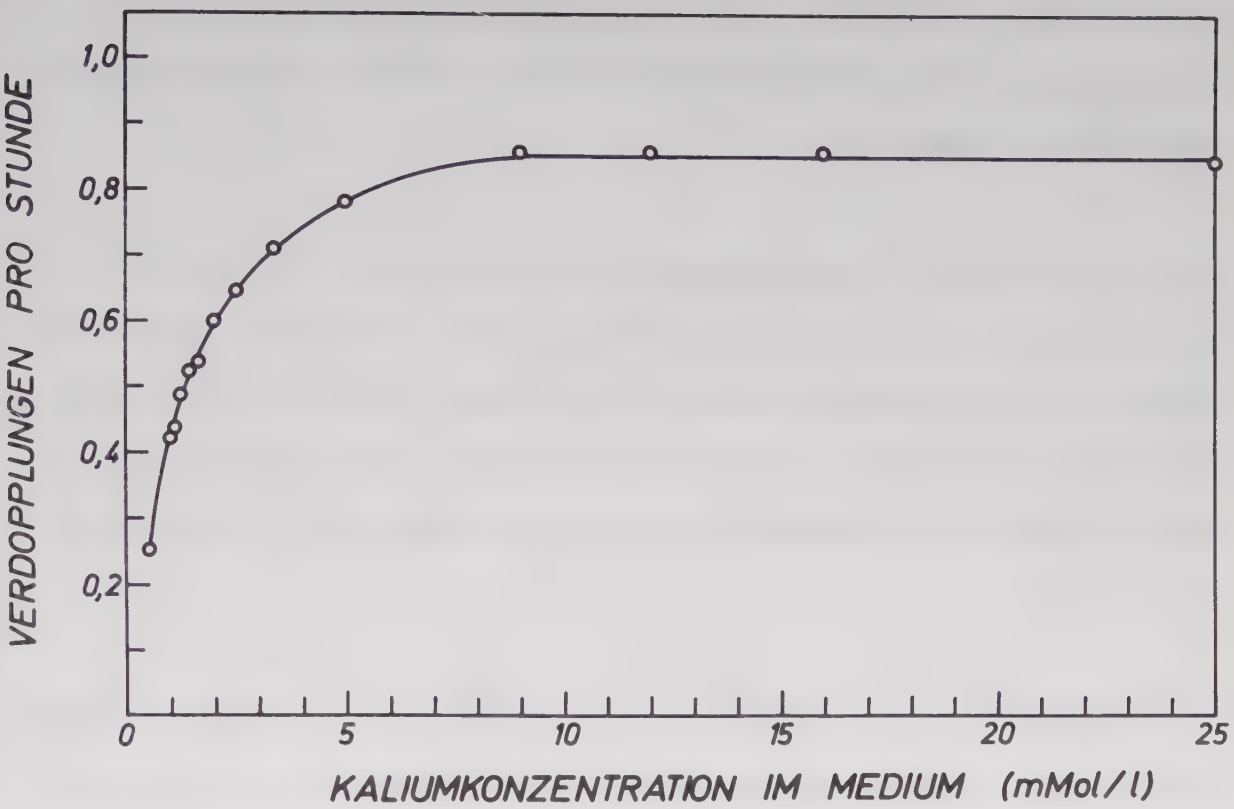

Abb. 27: Wachstumsgeschwindigkeit von E. coli B 525 in Abhängigkeit von der extrazellulären Kaliumkonzentration. Das Wachstum erfolgte im Medium A mit Histidin, Leucin und Methionin je 100 mg/l und Glucose 0,5 %. Die eingetragenen Werte sind Mittelwerte aus drei Versuchen.

Die lag-Phase nimmt mit Verringerung der extrazellulären Kaliumkonzentration zu. In Medien mit geringeren Kaliumkonzentrationen als 0,5 mMol/l ist aber erst nach 16 Stunden ein Wachstumsbeginn zu beobachten, der auf das Wachsen von Revertanten zurückgeht.

Die Messungen der Wachstumsgeschwindigkeit bei verringerten Natrium- und/oder Phosphatkonzentrationen erbrachte keine Veränderung der Wachstumsgeschwindigkeit und keine Verschiebung des Wachstumsbeginns zu kleineren extrazellulären Kaliumkonzentrationen. Die Meßwerte stimmen mit denen in Abb. 27 überein.

Abb. 28 zeigt aber, daß die reziproke Wachstumsgeschwindigkeit, die der Zeit für eine Verdopplung (τ) entspricht, linear von der reziproken extrazellulären Kaliumkonzentration abhängt.

In Abb. 29 ist das Verhältnis der extrazellulären Kaliumkonzentration und der Wachstumsgeschwindigkeit gegen die extrazelluläre Kaliumkonzentration aufgetragen.

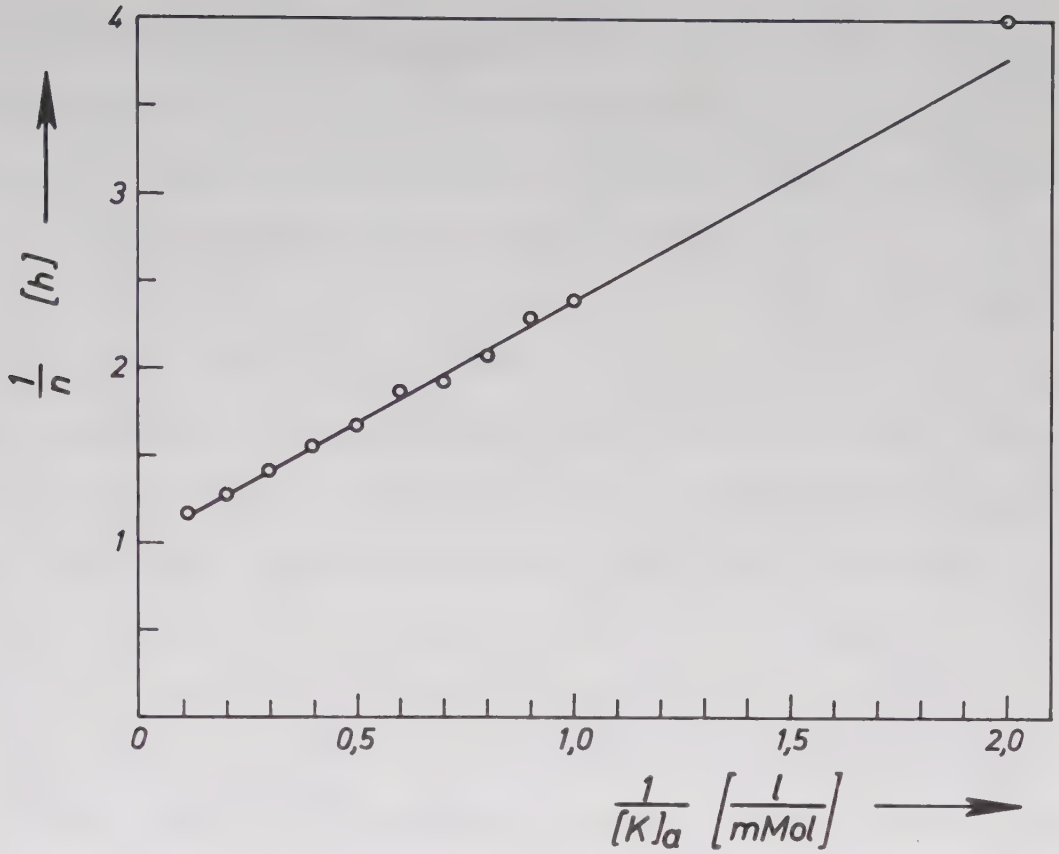

Abb. 28: Abhängigkeit der reziproken Wachstumsgeschwindigkeit von der reziproken extrazellulären Kaliumkonzentration.

n = Verdopplung pro Stunde

$[K]_a$ = extrazelluläre Kaliumkonzentration

Für die Darstellung wurden die Meßwerte der Abb. 27 verwendet.

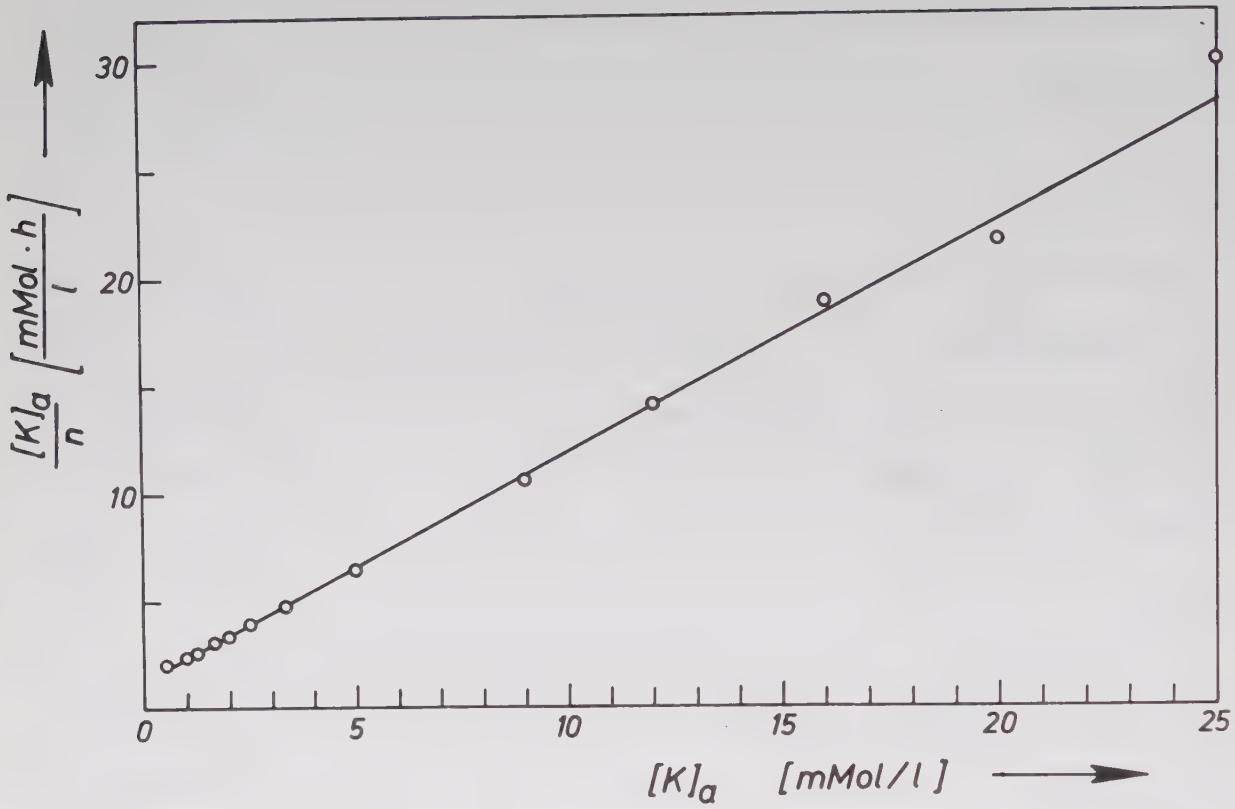

Abb. 29: Abhängigkeit des Verhältnisses der extrazellulären Kaliumkonzentration und der Wachstumsgeschwindigkeit von der extrazellulären Kaliumkonzentration.
Für die Darstellung wurden die Meßwerte der Abb. 27 verwendet.

6. DISKUSSION

Nach den vorliegenden Untersuchungen treten bei der Kaliummangelmutante E. coli B 525 charakteristische Unterschiede im Wachstum, im Kaliumtransport und in der Retention des Kaliums in der Zelle im Vergleich zum Wildtyp B 163 auf.

Der Befund von LUBIN und GÜNTHER, daß das Wachstum dieser Mutante im Gegensatz zum Wildtyp von der extrazellulären Kaliumkonzentration abhängt, konnte bestätigt werden. Ebenfalls konnte der eindeutige Beweis geliefert werden, daß zwischen der Wachstumsgeschwindigkeit und der intrazellulären Kaliumkonzentration ein linearer Zusammenhang besteht. Die Annahme von LUBIN, daß das Wachstum bzw. die Proteinsynthese durch die Kaliuminnenkonzentration gesteuert werden, scheint demnach gerechtfertigt zu sein. In dieser Arbeit wurde aber ein Hinweis gefunden, der zu einer Einschränkung dieser Aussage führt. Die Mutante benötigt zum Wachsen eine Mindestkonzentration an Kalium im Medium von etwa 0,5 mMol/l, unabhängig von der sich jeweils bei dieser Konzentration einstellenden Kaliuminnenkonzentration, die in diesem Kaliumkonzentrationsbereich auch eine Funktion der Natriumkonzentration im Medium ist.

Dieser Befund läßt sich zur Zeit nicht deuten. Möglicherweise besteht eine Beziehung zwischen dieser für die Mutante spezifischen Mindestkonzentration an Kalium zum Wachsen und der Änderung der Kaliumtransportkinetik, die in der Nähe dieser Konzentration bei variabler Natriumkonzentration im Medium beobachtet wird und im folgenden diskutiert werden soll.

Bei einer Natriumaußenkonzentration von 20 mMol/l besteht zwischen der stationären Kaliumverteilung bei E. coli B 525 und der Kaliumaußenkonzentration im untersuchten Konzentrationsbereich ein linearer Zusammenhang, der sich formal durch die Annahme eines saturierbaren Influxes nach einer Michaelis-Menten-Kinetik und eines linearen Effluxes deuten läßt.

$$\phi = \frac{\phi_{max} \cdot [K]_a}{K_m + [K]_a} - k_{ex} \cdot [K]_i = 0 \qquad \text{Gl. 3}$$

$$\frac{[K]_a}{[K]_i} = \frac{k_{ex} \cdot [K]_a}{\phi_{max}} + \frac{K_m \cdot k_{ex}}{\phi_{max}}$$

ϕ = Nettofluß [Mol/cm^2·sec]

ϕ_{max} = Influx bei Sättigung des Carriers [Mol/cm^2·sec]

k_{ex} = Geschwindigkeitskonstante für den Efflux [cm/sec]

K_m = Michaelis-Menten-Konstante [Mol/cm^3]

$[K]_a$ = extrazelluläre Kaliumkonzentration [Mol/cm^3]

$[K]_i$ = intrazelluläre Kaliumkonzentration [Mol/cm^3]

Wenn dieses Modell zutrifft, würden sich für den Kaliumtransport an E. coli B 525 die gleichen Gesetzmäßigkeiten ergeben, wie sie von RICKENBERG et al. (34) und RING und HEINZ (35) für den Transport an Zuckern und Aminosäuren an Bakterien gefunden wurden.

Die Michaelis-Menten-Konstante ergibt sich zu 0,37 mMol/l.

Bei einer Natriumaußenkonzentration von 100 mMol/l besteht zwischen der Kaliumverteilung und der Kaliumaußenkonzentration ebenfalls ein linearer Zusammenhang, jedoch nur für Kaliumaußenkonzentrationen oberhalb von 1,2 mMol/l. Die Michaelis-Menten-Konstante berechnet sich für diesen Konzentrationsbereich zu 0,87 mMol/l.

Die unterschiedlichen K_m-Werte für den Kaliuminflux bei einer Natriumaußenkonzentration von 20 bzw. 100 mMol/l lassen sich durch kompetitive Hemmung des Kaliumtransportes durch Natrium erklären.

Für Kaliumaußenkonzentrationen unterhalb von 1,2 mMol/l (bei einer Natriumaußenkonzentration von 100 mMol/l) gilt das obige Modell nicht mehr. Es stellt sich vielmehr eine von der Kaliumaußenkonzentration unabhängige stationäre Kaliumverteilung zwischen Medium und Zelle ein. Daher muß sich die Kinetik für den Influx und/oder Efflux geändert haben. Diese Kaliumverteilung läßt sich nicht im Sinne einer Donnanverteilung interpretieren, da sich ein Membranpotential von - 110 mV für diesen Bereich errechnet, das um eine Größenordnung kleiner ist als es sich aus der Chloridverteilung berechnet (- 17 mV).

Eine konstante Kaliumverteilung kann aber z.B. nach WILBRANDT und ROSENBERG (36) erwartet werden, wenn der Kaliumtransport über einen Carrier in beiden Richtungen durch die Membran nach einer Michaelis-Menten-Kinetik erfolgt. Unter diesen Bedingun-

gen kann es aber nur zu einer Anreicherung im Zellinnern kommen, wenn sich die beiden Dissoziationskonstanten des Carrier-Kalium-Komplexes an den beiden Phasengrenzen unterscheiden, d.h. die Membran muß asymmetrische Eigenschaften besitzen (z.B. durch Kopplung zu metabolischen Prozessen).

$$\phi = \phi_{max} \left[\frac{[K]_a}{K_{ma} + [K]_a} - \frac{[K]_i}{K_{mi} + [K]_i} \right] = 0 \qquad \text{Gl. 4}$$

$$\frac{[K]_a}{[K]_i} = \frac{K_{ma}}{K_{mi}}$$

Die Höhe der Akkumulation im Zellinnern im stationären Zustand hängt in diesem Falle nur von dem Verhältnis der beiden Dissoziationskonstanten ab und ist dementsprechend über den betreffenden Konzentrationsbereich konstant.

Der Gleichung 4 liegt die Annahme zugrunde, daß der Carrier-Kalium-Komplex neutral ist, und der Durchtritt durch die Membran gegenüber den vorgelagerten Gleichgewichtsreaktionen zwischen Carrier und Kalium geschwindigkeitsbestimmend und für den freien und beladenen Carrier gleich ist (siehe auch STEIN (37)).

Die beiden oben diskutierten Modelle beschreiben aber nur unvollständig die stationäre Kaliumverteilung für den gesamten Kaliumaußenkonzentrationsbereich bei der Natriumaußenkonzentration von 100 mMol/l.

Auch Modelle, bei denen neben Carriertransportanteilen passive Komponenten beteiligt sind, können nach den vorliegenden Ergebnissen nicht zutreffen, da sie zu nichtlinearen Zusammenhängen zwischen stationärer Kaliumverteilung und der Kaliumaußenkonzentration führen.

Die Annahme von GÜNTHER, daß der Kaliumefflux ebenso wie der Kaliuminflux über Carrier erfolgt, scheint deshalb gerechtfertigt zu sein, obgleich - wenn man ein Transportsystem für den gesamten Kaliumaußenkonzentrationsbereich fordert -, der Transport nicht durch einfache Gesetzmäßigkeiten beschrieben werden kann.

Möglicherweise trifft das von ARMSTRONG und ROTHSTEIN (38) aufgestellte Modell eines Carriers mit zwei "sites" zu. Über das eine "site" erfolgt der Transport des Kaliums, während durch die Anlagerung eines anderen Ions (z.B. Natrium) an das zweite "site" über nicht näher bekannte Wechselwirkungen die Maximalgeschwindigkeit des Carrier-Kalium-Komplexes beeinflußt werden kann. Diese Autoren fanden bei Kaliuminfluxmessungen an Hefezellen eine Änderung der Kinetik des Influxes bei einer Kaliumaußenkonzentration von 5 mMol/l, die sie nach dem erwähnten Modell durch einen Übergang von kompetitiver zu nichtkompetitiver Hemmung durch Natrium erklären.

EPSTEIN (39) und andere Autoren (siehe Zusammenfassung bei LÜTTGE (40)) fanden ebenfalls an Pflanzenzellen und -gewebe zwei für niedrige und höhere Konzentrationen unterschiedliche Transportsysteme für Kalium, Natrium und Chlorid. EPSTEIN deutet diese Ergebnisse durch die Annahme mehrerer "sites". Interessanterweise erfolgt der Übergang vom Aufnahmemechanismus bei niedrigen Konzentrationen zum Aufnahmemechanismus bei höheren Konzentrationen bei einer Konzentration von etwa 0,5 mMol/l.

Wie weit diese Modellvorstellung von EPSTEIN und ARMSTRONG für den Kaliumtransport bei E. coli B 525 zutrifft, läßt sich zur Zeit nicht entscheiden, zumal die Überlegungen dieser Autoren auch für den Kaliumefflux diskutiert werden könnten. In diesem Fall müßte auch die Änderung der Natriuminnenkonzentration bei niedrigen Kaliumaußenkonzentrationen berücksichtigt werden.

Die vorliegenden Meßergebnisse lassen aber auf jeden Fall erkennen, daß der Kaliumtransport bei dieser Mutante über einen anderen Mechanismus erfolgen muß, als er beim Wildtyp vorliegt oder als er an Bakterien für den Transport von Aminosäuren und Zuckern von HEINZ und anderen Autoren gefunden wurde.

Die Kaliuminnenkonzentration bei der Kaliummangelmutante E. coli B 525 ist nicht nur eine Funktion der extrazellulären Kalium- und Natriumkonzentration. In spezifischer Weise wird vielmehr die aufgenommene Kaliummenge durch die beiden Aminosäuren Histidin/Leucin, durch Ammonium und durch die Eigenschaften des Substrates beeinflußt. Die vorliegenden Experimente zeigen, daß im Unterschied zu E. coli B 163 eine über mehrere Stunden stationäre Kaliumverteilung für E. coli B 525 bei 37 °C, einer Kaliumaußenkonzentration von 12 mMol/l und einem pH-Wert von 7 erst zwei Stunden nach Glucosezugabe zum Inkubationsmedium erreicht wird, und zwar nur, wenn Ammonium oder die Aminosäurekombination Histidin/Leucin anwesend sind.

In Inkubationsmedien ohne diese beiden Verbindungen nimmt die Kaliuminnenkonzentration, die nach Glucose-Zugabe innerhalb von 5 - 10 Minuten auf den maximalen Wert von 180 - 200 mMol/l ansteigt, in einem Zeitraum von vier Stunden langsam, aber stetig bis auf einen Endwert von etwa 60 mMol/l ab, ohne daß es zu einer entsprechenden Natriumaufnahme kommt. Diese Abnahme kann nicht durch eine irreversible Störung der Transportfähigkeit der Bakterien erklärt werden, da bei Zugabe von Ammonium oder Histidin/Leucin nach vier bzw. zwei Stunden die Kaliuminnenkonzentration wieder zunimmt. Die Kaliuminnenkonzentration, die sich unter diesen Bedingungen einstellt, ist sofort über mehrere Stunden stabil.

Die Wirkung dieser Substanzen auf den Kaliumtransport läßt sich nach den Atmungsmessungen und Glucoseverbrauch nicht durch eine Erhöhung des Stoffwechselumsatzes erklären.

Die Reaktion von Ammonium und den beiden Aminosäuren ist sehr spezifisch. Methionin sowie die Aminosäuren Methionin/Leucin und Methionin/Histidin oder andere Kombinationen, bei denen Histidin oder Leucin durch chemisch ähnliche Verbindungen ersetzt wurden oder auch die Zugabe von 17 weiteren Aminosäuren zeigen keinen ausgeprägten Effekt.

Bei 20 mMol/l Ammonium stellt sich eine stationäre Kaliuminnenkonzentration von etwa 140 mMol/l ein, während sie bei einer Konzentration an Histidin und Leucin von je 100 mg/l um etwa 20 mMol/l höher liegt.

Für die Aufnahme an Kalium, die zusätzlich bei Zugabe von 100 mg/l Histidin/Leucin zu der sich in Gegenwart von 20 mMol/l Ammonium einstellenden Kaliuminnenkonzentration auftritt, scheint überwiegend Leucin, für die Stabilisierung der stationären Kaliumverteilung Histidin verantwortlich zu sein. Diese Eigenschaft des Histidins könnte vielleicht in seiner Pufferwirkung im physiologischen pH-Bereich zu suchen sein. Hierfür spricht auch das Experiment der Abb. 11 , bei dem Histidin durch Imidazol ersetzt wurde.

Der Befund, daß eine Aminosäure wie Leucin die stationäre Kaliuminnenkonzentration erhöhen kann, stimmt qualitativ mit Ergebnissen von GALE (41) und DAVIES (42) überein (siehe auch Zusammenfassung bei RING (43)).

Diese Autoren fanden bei Staphylococcus aureus nach Einstellung der stationären Kaliuminnenkonzentration in einem gluco-

haltigen Inkubationsmedium nach Zugabe von Glutaminsäure eine Zunahme des Kaliumgehaltes, die zur aufgenommenen Glutaminsäure im Verhältnis 1 : 1 stand. Während sich die Wechselwirkung zwischen Glutaminsäure- und Kaliumtransport aufgrund des Anionencharakters von Glutamat durch eine Flußkopplung erklären lassen kann, besteht diese Deutungsmöglichkeit für den Effekt des Leucins nicht, zumal Leucin und Kalium unter unserer Bedingungen im Verhältnis 1 : 3 in der Zelle angereichert werden.

Der unterschiedliche Einfluß von Substraten auf den zeitlichen Verlauf der intrazellulären Kaliumkonzentration bei E. coli B 525 läßt vielmehr auf eine regulierende Rolle von Glucose oder Glucosephosphat bzw. allgemein von freien oder phosphorylierten Zuckern in der Zelle auf den Kaliuminflux und/oder -efflux schließen.

Eine Abnahme der Kaliuminnenkonzentration bei E. coli B 525 wird bei auf Lactose gewachsenen Bakterien nur beobachtet, wenn Fructose, Galactose, Lactose, Glucose oder Arabinose als Substrat zum Inkubationsmedium zugegeben werden.

Der Abbau dieser Substrate beginnt mit Zuckerphosphaten. In Bakterien aber, die mit Glycerin als Substrat gewachsen sind und in Medien mit Glycerin inkubiert worden sind, ist die intrazelluläre Kaliumkonzentration sofort - oder spätestens nach 30 Minuten - stationär. Der Abbau beginnt in diesem Fall mit Glycerinphosphat.

Auch Zucker, die von E. coli B 525 nicht zum Wachstum verwen-

det werden können,rufen eine Kaliumabnahme hervor, wenn sie zusätzlich zu Bakterien, die an Glycerin adaptiert und in Medien mit Glycerin inkubiert worden sind, gegeben werden.

Zu diesem Zuckern gehören 2-Deoxyglucose und α-Methylglucosid. Da die beiden Zucker 2- Deoxyglucose und α-Methylglucosid in der Zelle nur frei und phosphoryliert vorliegen und nicht weiter im Stoffwechsel abgebaut werden können (44) (45) (46), kann die mögliche Zahl der in Frage kommenden Verbindungen, die eine Abnahme der Kaliuminnenkonzentration bewirken, auf die freien oder phosphorylierten Zucker eingeengt werden.

Infolge der unterschiedlichen Eigenschaften der Substrate kann aber auf jeden Fall ausgeschlossen werden, daß der Ausfluß von Wasserstoffionen der primäre Prozeß ist, der den Kaliumverlust erzeugt. Man muß jedoch eine unterschiedliche Produktion oder einen unterschiedlichen Nettoefflux von Wasserstoffionen annehmen, da der Kaliumverlust nur teilweise durch die Aufnahme von Natrium aus dem Medium kompensiert wird (47).

Die fehlende Wirkung von Sucrose und Raffinose auf die intrazelluläre Kaliumkonzentration läßt sich durch die naheliegende Annahme deuten, daß diese Substanzen nicht oder nur sehr beschränkt durch die Zellmembran permeieren können.

Für die Annahme, daß Hexosen oder ihre Phosphatester die Kaliumabnahme bei E. coli B 525 hervorrufen, sprechen auch die Experimente, die unter Bedingungen durchgeführt wurden, bei denen die Konzentrationen an diesen beiden Verbindungen in

der Zelle gesenkt werden. Ammonium steigert z. B. die aerobe Glykolyse durch spezifische Aktivierung der Phosphofructokinase (48) (49). Die Glucose-6-phosphat-Konzentration wird entsprechend gesenkt. Außerdem wird Ammonium zur Aminierung von Ketosäuren verbraucht (50). Das bei dieser Reaktion entstehende NADP bewirkt einen zusätzlichen Abbau von Glucose-6-phosphat durch die G6P-Dehydrogensase (30). Die optimale Konzentration an Ammonium zur Aktivierung der Phosphofructokinase liegt zwischen 20 mMol/l und 50 mMol/l und stimmt deshalb gut mit der Konzentration überein, die zur Stabilisierung der Kaliuminnenkonzentration benötigt wird.

Abgesehen von diesen Effekten, könnte Ammonium den pH-Wert des Zellinneren erhöhen und somit indirekt die Glykolyse und wahrscheinlich auch den K-H-Austausch beeinflussen (51).

Eine Steigerung der Glykolyse wird außerdem unter anaeroben Bedingungen gefunden. Entsprechend sinkt die Hexosephosphatkonzentration im Zellinnern ab. Auch in diesem Fall wird die stationäre Phase III in den Zellen erreicht, ohne daß das Medium die Aminosäuren Histidin/Leucin oder Ammonium enthält.

Hohe Phosphatkonzentrationen im Inkubationsmedium haben keinen Einfluß auf die Retention von Kalium in den Zellen von B 525. Dieses Ergebnis stimmt mit den Experimenten von LOWRY et al. (52) an E. coli überein. Diese Autoren fanden, daß die aus E. coli isolierte Phosphofructokinase durch eine Phosphatkonzentration von 5 mMol/l inhibiert wird. Folglich sollte der Level der Hexosen und Hexosephosphate in den Zellen nicht

durch steigende Phosphatkonzentrationen im Medium erhöht werden.

Wie experimentell gezeigt werden konnte, wird der Glucosephosphatspiegel in B 525 durch Ammonium um 40 %, durch Histidin und Leucin um 10 % gesenkt. Allerdings findet man eine ähnliche Abnahme der Glucosephosphatkonzentration auch in B 163 in Gegenwart von Ammonium und Histidin/Leucin sowie in Zellen beider Stämme nach Zugabe anderer Aminosäuren, die nicht spezifisch auf die Kaliumretention reagieren.

Deshalb kann wohl ausgeschlossen werden, daß das unterschiedliche Verhalten der Mutante und des Wildtyps in der Kaliumretention nur durch einen verschieden hohen Spiegel von Hexosephosphaten in der Zelle hervorgerufen wird. Wenn man dennoch davon ausgeht, daß die Hypothese einer Kontrolle der intrazellulären Kaliumkonzentration durch freie oder phosphorylierte Hexosen richtig ist, so muß man die Mutation eines Membranproteins fordern, das in den Transport des Kaliums involviert ist und direkt oder indirekt durch Hexosen oder Hexosephosphate beeinflußt wird.

In diesem Zusammenhang sind Untersuchungen von HAROLD (53) interessant, die ebenfalls auf eine Permeabilitätsänderung von Membranen durch Hexosen und Hexosephosphate hinweisen könnten.

Zellen von Streptococcus faecalis verlieren kaum Kalium, wenn sie in Natriumchlorid-Lösungen mit oder ohne Glucose inkubiert werden. Zugabe von DCCD (N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid) zu Me-

dien, die zunächst keine Glucose enthielten, führte zu einem leichten Verlust an Kalium, der durch Glucose um ein mehrfaches gesteigert werden konnte. DCCD reagiert bei Streptococcus primär mit einer Zellmembrankomponente - wahrscheinlich mit einer Proteinkomponenten eines Lipoproteins - und hemmt dadurch sekundär die Transport-ATPase und den selektiven Kaliumtransport. Als Folge hiervon wird der Abbau von ATP und die Glycolyse stark gehemmt, so daß die Konzentration der Hexosephosphate in den Zellen ansteigen sollte.

Aufgrund der Analogie zwischen der Wirkung von DCCD auf die Membranpermeabilität und der durch die Mutation bei B 525 hervorgerufenen Membranpermeabilität könnte in beiden Fällen eine Wechselwirkung der Hexosen oder ihrer Phosphate auf eine Membrankomponente geschlossen werden, was zu einem verstärkten Efflux von Kalium nach Zugabe von Glucose führt.

Gestützt wird diese Annahme durch einige vorläufige Versuche mit DCCD an Zellen von B 525 (Abb. 30). DCCD hebt den Effekt von Histidin und Leucin auf. Das Kalium fließt aus der Zelle.

Obgleich deshalb die Hypothese einer regulierenden Rolle der Hexosen oder ihrer Phosphate auf die intrazelluläre Kaliumkonzentration sehr attraktiv erscheint, läßt sich der signifikante Effekt von Histidin und Leucin nicht erklären, da die Glucosephosphatkonzentration nicht in entsprechender Weise wie im Falle des wesentlich unspezifischer reagierenden Ammoniums gesenkt wird.

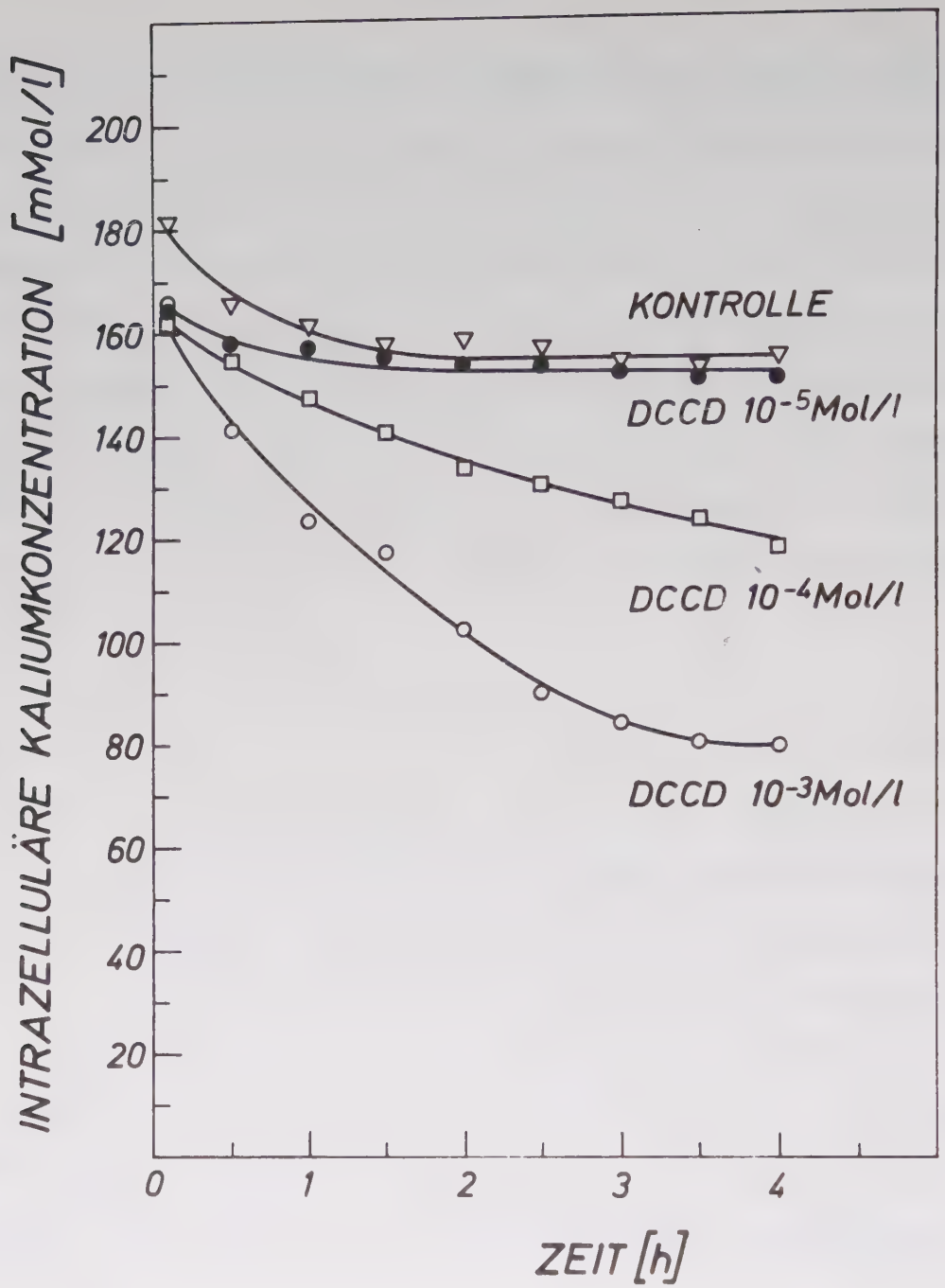

Abb. 30: Effekt von N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (10^{-3}, 10^{-4} und 10^{-5} Mol/l) auf die intrazelluläre Kaliumkonzentration bei E. coli B 525. Das DCCD wurde in fester Form dem Inkubationsmedium bei 37 °C hinzugefügt und nach dem Schmelzen emulgiert. Das Medium enthielt Histidin und Leucin (je 100 mg/l) und 1% Glucose. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne DCCD.
Die eingezeichneten Werte sind Mittelwerte aus 3 Meßreihen mit je 2 Meßwerten.

Zur Zeit ist eine einzige Arbeit bekannt, in der ebenfalls ein Effekt demonstriert werden konnte, der auf der spezifischen Wirkung zweier Aminosäuren, nämlich Histidin und Methionin, beruht. CLEAVES und COHEN (54) fanden, daß die Erholungsphase nach Magnesiumzugabe zu magnesium-ausgehungerten Zellen von E. coli B sehr stark durch Histidin und Methionin stimuliert werden konnte. Beide Aminosäuren wirkten nur gemeinsam. Andere Aminosäuren zeigten keine Wirkung. Da die Zellen unter diesen Bedingungen bevorzugt Ribosomen synthetisierten,vermuteten die Autoren, daß die beiden betreffenden Aminosäuren spezifisch auf die ribosomale RNS-Synthese wirken.

Die Annahme, daß vielleicht eine Beziehung zwischen der RNS und der Kaliumretention bestehen könnte, wird auch durch Experimente von LUBIN (55) gestützt. LUBIN fand Hinweise für eine wichtige Startreaktion bei der Proteinsynthese, an der Ribosome und m-RNS beteiligt waren und die spezifisch durch Kalium stimuliert wurde.

Weiterhin sprechen die oben erwähnten Versuche über die Verteilung der Radioaktivität nach Ribose-C-14-Aufnahme in B 525 für einen Einfluß von RNS oder von Zwischenprodukten der RNS-Synthese auf die Kaliumretention.

Proflavin, das die Bindung von RNS-Polymerase-Molekülen an spezifische Bindungsstellen der DNS-Matrize hemmt (56), hebt bei B 525 nach Abb. 31 in einer Konzentration von 10 mg/l den stabilisierenden Effekt von Histidin und Leucin auf die intrazelluläre Kaliumkonzentration in der Phase III auf.

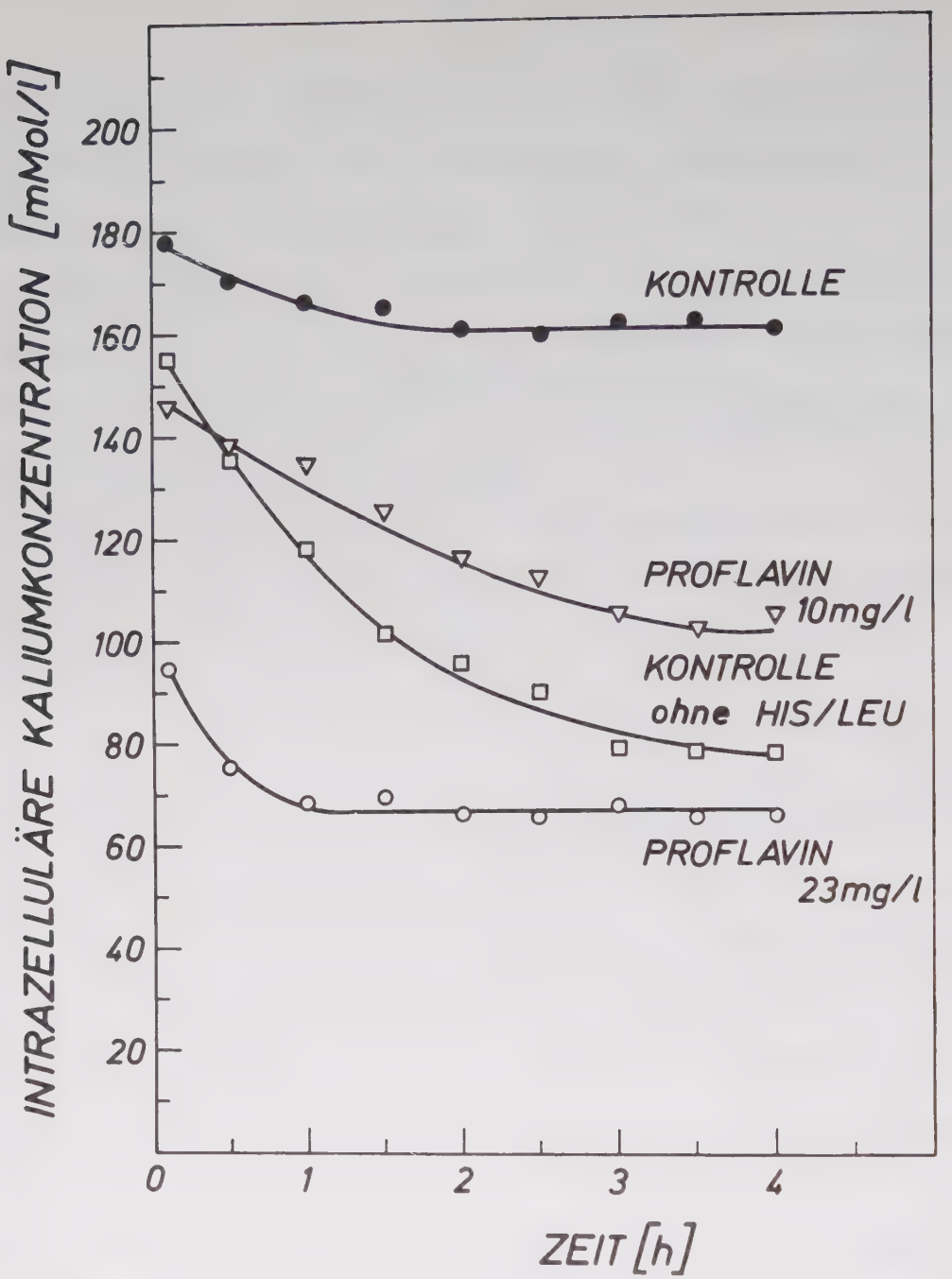

Abb. 31: Effekt von Proflavin (10 und 23 mg/l) auf die intrazelluläre Kaliumkonzentration bei E. coli B 525 bei Inkubation in Medien mit Histidin/Leucin (je 100 mg/l) und 1% Glucose. Die Kontrolle enthielt kein Proflavin. Eine weitere Kontrollmessung wurde in Abwesenheit von Histidin/Leucin und Proflavin durchgeführt.
Die eingezeichneten Werte sind Mittelwerte aus 2 bzw. 3 Meßreihen mit je 2 Meßwerten.

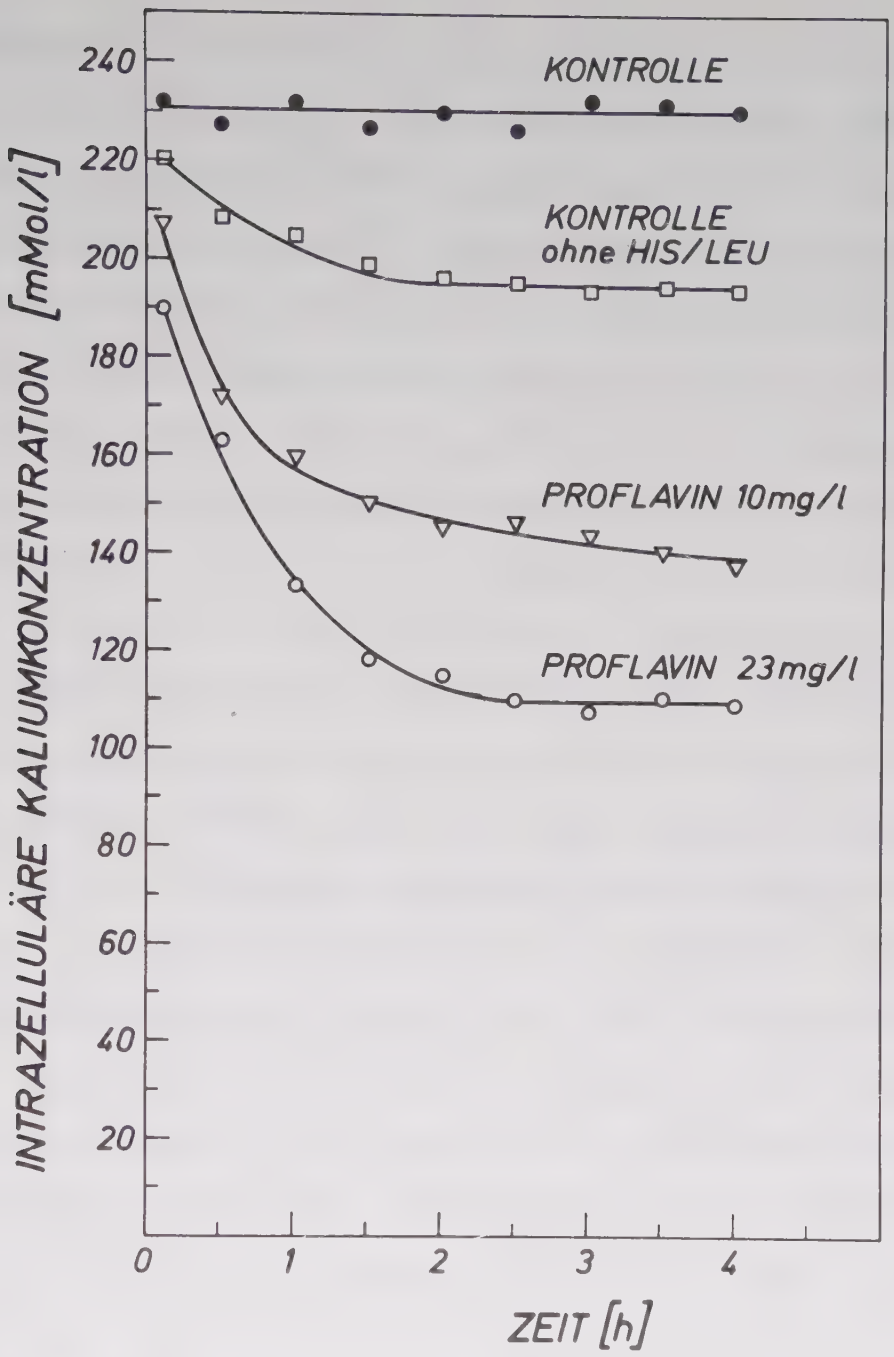

Abb. 32: Effekt von Proflavin (10 und 23 mg/1) auf die intrazelluläre Kaliumkonzentration bei E. coli B 163 bei Inkubation in Medien mit Histidin und Leucin (je 100 mg/1) und 1% Glucose. Die Kontrolle enthielt kein Proflavin. Eine weitere Kontrollmessung wurde in Abwesenheit von Histidin/Leucin und Proflavin durchgeführt.

Die eingezeichneten Werte sind Mittelwerte aus 2 Meßreihen mit je 2 Meßwerten.

Bei einer Proflavinkonzentration von 23 mg/l, die gewöhnlich zur Hemmung der RNS-Synthese in der Literatur verwendet wird, wird bereits die Kaliumakkumulation in der Phase I stark reduziert. Da die gleiche Abnahme der intrazellulären Kaliumkonzentration durch Proflavinzugabe auch beim Wildtyp beobachtet wird, lassen diese Versuche zumindest den Schluß zu, daß der Kaliumspiegel in beiden Stämmen der RNS-Synthese-Kontrolle unterworfen ist, falls der Effekt von Proflavin auf die RNS wirklich spezifisch ist (Abb. 32).

Der Effekt von Proflavin auf die intrazelluläre Kaliumkonzentration ist reversibel, da eine erneute Kaliumakkumulation beobachtet werden konnte, wenn die Zellen nach mehrmaligem Waschen in Medien ohne Proflavin reinkubiert wurden.

Es ist nun aus der Literatur bekannt, daß die Synthese der RNS in Stämmen mit "stringent control" von der Gegenwart der essentiellen Aminosäuren abhängt, während in Bakterien mit einer "relaxed control" die RNS-Synthese auch in Abwesenheit der essentiellen Aminosäuren weiter läuft (57).

Da es bisher nicht möglich war, RC^{rel}-Mutanten vom RC^{str}-Stamm E. coli B zu isolieren (58), sollte die RNS-Synthese in B 525 und B 163 unter den experimentellen Bedingungen dieser Arbeit (Abwesenheit der essentiellen Aminosäure Methionin) auf einige Prozent abgenommen haben. Das Proflavin-Experiment zeigt, daß der RNS-Level unter Aminosäuremangelbedingungen notwendig für eine stabile Kaliumkonzentration in beiden Stämmen ist.

Weiter oben wurde erwähnt, daß Chloramphenicol keine Wirkung auf den zeitlichen Verlauf der Kaliumkonzentration in Zellen von B 525, die in Medien mit oder ohne Histidin/Leucin inkubiert worden waren, hat. Die Proteinsynthese scheint deshalb keine bedeutende Rolle für die Stabilisierung der intrazellulären Kaliumkonzentration zu spielen.

Da aber in beiden Stämmen die intrazelluläre Kaliumkonzentration nach Zugabe von Proflavin abnimmt, läßt sich zur Zeit über eine Rolle von Histidin und Leucin bei Prozessen der RNS-Synthese und der RNS-Stabilität, die möglicherweise die Kaliumflüsse beeinflussen, nichts aussagen. Eine Aussage über eine die intrazelluläre Kaliumkonzentration regulierende Substanz kann aber von der erfolgreichen Identifizierung der Verbindung erwartet werden, in die der überwiegende Teil der Aktivität nach Ribose-C-14-Aufnahme eingebaut wird.

Abschließend sei darauf hingewiesen, daß die Hypothese einer Kontrolle des Kaliumspiegels in B 525 durch Hexosephosphate oder Hexosen nicht im Gegensatz zu der Annahme einer Kontrolle der RNS steht. Nach IRR und GALANT (59) unterliegt sowohl der Energiemetabolismus wie auch die RNS-Synthese der "stringent control".

7. ZUSAMMENFASSUNG

Die Kaliummangelmutante E. coli B 525, die neben Histidin, Leucin und Methionin im Gegensatz zu ihrem Wildtyp B 163 eine erhöhte extrazelluläre Kaliumkonzentration zum Wachstum benötigt, ist nicht fähig, eine konstante intrazelluläre Kaliumkonzentration über mehrere Stunden aufrechtzuerhalten. Im Mineralmedium mit 1 % Glucose als Substrat und einer konstanten extrazellulären Kaliumkonzentration von 12 mMol/l nimmt bei ihr die intrazelluläre Kaliumkonzentration von etwa 180 mMol/l im Verlauf von vier Stunden bis auf ca. 60 mMol/l ab. Die intrazelluläre Kaliumkonzentration beim Wildtyp, die sich ebenso wie bei der Kaliummangelmutante innerhalb weniger Minuten nach Inkubationsbeginn in den Zellen einstellt, nimmt dagegen nur wenig ab und erreicht nach etwa 1 - 2 Stunden einen stationären Wert.

Die Abnahme der intrazellulären Kaliumkonzentration bei der Mutante B 525 kann unter aeroben Bedingungen unterbunden werden, wenn dem Inkubationsmedium die beiden zum Wachstum benötigten Aminosäuren Histidin und Leucin oder Ammoniumchlorid zugegeben werden. Unter diesen Bedingungen wird nach etwa 1 - 2 Stunden ebenfalls ein stationärer Kaliumspiegel in den Zellen erreicht. Die beiden Aminosäuren Histidin und Leucin wirken nur, wenn sie gemeinsam im Medium vorhanden sind. Ihr Einfluß auf die Kaliumretention ist äußerst spezifisch, da andere Aminosäuren, die zum Teil einzeln, zum Teil in Gemischen zum Inkubationsmedium zugegeben worden waren, keine Stabilisierung der Kaliuminnenkonzentration in den Zellen der Kaliummangelmutante bewirkten. Der Effekt von Histidin/Leucin und Ammonium ist konzentrations-

abhängig. Er läßt sich nicht durch eine Erhöhung des Stoffwechselumsatzes erklären, da mit Aminosäuren, die keinen spezifischen Effekt auf die Kaliumretention zeigten, keine Änderung der Atmung und des Glucoseverbrauchs gemessen wurde.

Die Kaliumabnahme bei B 525 hängt von der Art des Substrates im Inkubationsmedium ab. In Gegenwart von Fructose, Galactose, Lactose oder Arabinose (je 1 %) wird eine ähnliche Kaliumabnahme beobachtet, wie sie weiter oben für die Inkubation in Medien mit 1 % Glucose beschrieben wurde. Auch diese Abnahme der intrazellulären Kaliumkonzentration kann durch Zugabe von Histidin/Leucin oder Ammonium aufgehoben werden.

Eine konstante Kaliumkonzentration stellt sich nach Inkubation in Medien mit 1% Glycerin ein, wenn die Zellen von B 525 mit Glycerin als Substrat gewachsen waren. Die intrazelluläre Kaliumkonzentration beträgt unter diesen Bedingungen nur etwa 80 mMol/l und läßt sich durch Zugabe von Histidin und Leucin nur um 10 mMol/l erhöhen. Da der Abbau des Glycerins im Stoffwechsel über Glycerinphosphat beginnt und dementsprechend die Hexosephosphatkonzentrationen in den Zellen sehr gering sind, könnte dieser Befund auf einen Einfluß der Verbindungen auf die Regulation der intrazellulären Kaliumkonzentration hinweisen.

Die Hypothese könnte ebenfalls die stabilisierende Wirkung von Ammonium auf die intrazelluläre Kaliumkonzentration erklären, da unter diesen Bedingungen die intrazelluläre Glucosephosphatkonzentration gesenkt wird, wie experimentell gezeigt werden konnte. Ammonium steigert die aerobe Glykolyse durch spezifische

Aktivierung der Phosphofructokinase. Die optimale Ammoniumkonzentration zur Aktivierung stimmt mit der Konzentration von 20 mMol/l überein, die zur optimalen Stabilisierung der Kaliumkonzentration in den Zellen von B 525 benötigt wird.

Die Hypothese einer regulierenden Rolle der Hexosephosphate auf die intrazelluläre Kaliumkonzentration in B 525 wird ebenfalls durch den Befund gestützt, daß sich eine stationäre Kaliumkonzentration in den Zellen in Abwesenheit von Histidin/Leucin oder Ammonium unter aneroben Bedingungen einstellt.

Weiterhin sprechen Experimente für diese Hypothese, in denen die oben genannten Hexosen zu Glycerin-gewachsenen Zellen, die in Medien mit Glycerin als Substrat vorinkubiert worden waren, zusätzlich hinzugefügt wurden. Nach Zugabe dieser Zucker nimmt die Kaliumkonzentration in den Zellen wieder zu. So steigt sie z. B. bei Glucose auf eine Höhe von etwa 160 mMol/l und sinkt anschließend im Verlauf von etwa drei Stunden auf einen Level von 50 mMol/l, d.h. unter den des Kontrollwertes von 80 mMol/l im glycerinhaltigen Medium. Die Zugabe von 2-Deoxyglucose und α-Methylglucosid, die in der Zelle nur frei oder phosphorylliert vorliegen und nicht weiter abgebaut werden, führen ebenfalls zu einer leichten Abnahme der intrazellulären Kaliumkonzentration bei Glycerin-vorinkubierten Zellen von B 525. Eine wesentlich größere Abnahme der Kaliumkonzentration wird unter gleichen Versuchsbedingungen bei Zugabe von Ribose gefunden, einem Zucker, der von der Mutante und vom Wildtyp nicht zum Wachstum verwendet werden kann.

Die genannten Zucker beeinflussen die stationäre Kaliumverteilung in den Zellen von B 163 nicht, so daß die beschriebenen Befunde bei B 525 auf die Mutation zurückgeführt werden müssen. Allerdings dürfte das unterschiedliche Verhalten von Mutante und Wildtyp nicht nur auf einen verschieden hohen Glucosephosphatspiegel zurückzuführen sein, da die beiden Aminosäuren Histidin/Leucin, die den ausgeprägten Effekt auf die Kaliumretention zeigen, ebenso wie andere, unspezifisch reagierende Aminosäuren nur geringfügig die intrazelluläre Glucosephosphat-Konzentration senken. Vielmehr muß die Mutation einer Membrankomponente gefordert werden, über die die Hexosephosphate den Kaliumtranport beeinflussen können.

Obleich die Hypothese einer regulierenden Rolle der Hexosephosphate auf die intrazelluläre Kaliumkonzentration bei B 525 eine Reihe von Experimenten befriedigend erklärt, dürfte wahrscheinlich die RNS ebenfalls die Kaliumretention in Zellen von B 525 beeinflussen.

Untersuchungen bei Zellen, die in Medien mit radioaktiv markierter Ribose inkubiert worden waren, zeigten nämlich, daß etwa 30 % der Aktivität in die RNS-Fraktion eingebaut wird. Die Hauptaktivität wird aber in einem noch nicht identifizierten Zwischenprodukt gefunden. Diese Verbindung ist aber kein Zwischenprodukt der Glykolyse, möglicherweise aber ein Zwischenprodukt der RNS-Synthese. Die Aufhebung des stabilisierenden Effektes von Histidin und Leucin auf die intrazelluläre Kaliumkonzentration von B 525 durch Proflvin weist ebenfalls auf eine regulierende Rolle von RNS auf die Kaliumkonzentration hin. Da eine Kalium-

abnahme unter dem Einfluß von Proflavin auch bei Zellen von B 163 beobachtet wurde, kann zur Zeit noch nicht entschieden werden, ob die Wirkung von Histidin und Leucin über den RNS-Spiegel in den Zellen von B 525 erfolgt. Da Chloramphenicol weder in Gegenwart von Histidin/Leucin noch in Abwesenheit dieser beiden Aminosäuren eine Wirkung auf die intrazelluläre Kaliumkonzentration zeigt, kann eine Beeinflussung der Kaliumkonzentration durch die Proteinsynthese ausgeschlossen werden.

Untersuchungen über die stationäre Kaliumverteilung in Zellen von B 525 unter stationären Bedingungen, d.h. in Gegenwart von Histidin und Leucin, zeigten, daß die Kaliumverteilung eine lineare Funktion der extrazellulären Kaliumkonzentration ist. Dieser lineare Zusammenhang wird aber nur bei einer extrazellulären Natriumkonzentration von 20 mMol/l gefunden. Bei hohen Natriumkonzentrationen (100 mMol/l) ist dagegen die Kaliumverteilung bei niedrigen Kaliumkonzentrationen im Medium konstant. Da eine Donnanverteilung in diesem Bereich durch Bestimmung des Membranpotentials über die Chloridverteilung ausgeschlossen werden kann, wird ein Carrier mit zwei "sites" zur Deutung dieses Phänomens diskutiert, das bisher nur von Hefe- und Pflanzenzellen her bekannt war.

Literaturverzeichnis

(1) F.B. STRAUB, Acta Physiol. Acad. Sci. Hung. 4, 235 (1953)

(2) A.B. PARDEE, Science 162, 632 (1968)

(3) A.L. LEHNINGER, Biochemistry, The Molekular Basis of Cell Structure and Function, Worth Publishers, Inc 1970

(4) Y. ANRAKU, J. Biol. Chem. 242, 793 (1967)

(5) G.N. LING, Proceedings of the First European Biophysics Congress, Banden, 3, 489 (1971)

(6) R.D. KEYNES und G.W. MAISEL, Proc. roy. Soc. B 142, 383 (1954)

(7) M. LUBIN, in: The Cellular Functions of Membrane Transport, ed. J.F. HOFFMANN, Prentice Hall, Englewood Cliffs 1964

(8) S.H. SUELTER, Science 168, 789 (1970)

(9) M. LUBIN, Federation Proc. 23, 994 (1964)

(10) D.F. BAKER, A.L. HODGKIN und J.H. SHAW, Nature 190, 885 (1961)

(11) R. DAMADIAN, J. Bacteriol 95, 113 (1968)

(12) C. SLAYMAN und E.L. TATUM, Biochim. Biophys. Acta 109, 184 (1965)

(13) M. BURMEISTER, J. Bacteriol 100, 796 (1969)

(14) M. LUBIN und D. KESSEL, Biochem. Biophys. Res. Commun. 2, 249 (1960)

(15) F.M. HAROLD, R.L. HAROLD, J.R. BAARDA und A. ABRAMS, Biochemistry 6, 1777 (1967)

(16) D.B. WILLIS und H.L. ENNIS, J. Bacteriol. 96, 2035 (1968)

(17) W. EPSTEIN und M. DAVIES, J. Bacteriol. 101, 836 (1970)

(18) W. EPSTEIN und B.S. KIM, J. Bacteriol. 108, 639 (1971)

(19) TH. GÜNTHER und F. DORN, Z. Naturforsch. 21 b, 1082 (1966)

(20) B. LUBOCHINSKY, J. MEURY und J. STOLKOWSKY, C. R. hebd. Séances Acad. Sci. 258, 5106 (1964)

(21) M. LUBIN und H.L. ENNIS, Biochim. Biophys. Acta 80, 614 (1964)

(22) TH. GÜNTHER und F. DORN, Z. Naturforsch. 21 b, 1076 (1966)

(23) TH. GÜNTHER, Z. Naturforsch. 23 b, 330 (1968)

(24) J.E. LEDERBERG und E.M. LEDERBERG, J. Bacteriol. 63, 399 (1952)

(25) S.G. SCHULTZ und A.K. SOLOMON, J. gen. Physiol. 45, 355 (1961)

(26) B.D. DAVIS und E.S. MINGIOLI, J. Bacteriol. 60, 17 (1950)

(27) O.H. LOWRY, J. CARTER, J.B. WARD und L. GLASER, J. Biol. Chem. 246, 6511 (1971)

(28) U. ZIMMERMANN und G. PILWAT, Z. Naturforsch. 26 b, 887 (1971)

(29) U. ZIMMERMANN, G. PILWAT und TH. GÜNTHER, Biochim. Biophys. Acta (im Druck)

(30) H. HOLZER, Cold Spring Harbour Symposia on quantitative Biology Vol. XXVI, 277 (1961)

(31) G. PILWAT und U. ZIMMERMANN, Z. Naturforsch. 27 b, 62 (1972)

(32) W. EPSTEIN und S.G. SCHULTZ, J. gen. Physiol. 49, 221 (1965)

(33) S.G. SCHULTZ, N.L. WILSON und W. EPSTEIN, J. gen. Physiol. 46, 159 (1962)

(34) H.V. RICKENBERG, G.N. COHEN, G. BUTTIN und J. MONOD, Ann Inst. Pasteur 91, 829 (1956)

(35) K. RING und E. HEINZ, Biochem. Z. 344, 466 (1966)

(36) W. WILBRAND und T. ROSENBERG, Pharmacol. Rev. 13, 109 (1961)

(37) W.D. STEIN, The Movement of Molecules Across Cell Membranes, Academic Press, New York and London 1967

(38) W.McD. ARMSTRONG und A. ROTHSTEIN, J. gen. Physiol. 50, 967 (1967)

(39) E. EPSTEIN u. D.W. RAINS, Proc. nat. Acad. Sci. USA 53, 1320 (1965)

(40) U. LÜTTGE, Aktiver Transport (Kurzstreckentransport bei Pflanzen), Protoplasmatologia VIII, 7 b, Springer-Verlag, Berlin 1969

(41) E. GALE, Advances Protein Chem. 8, 285 (1953)

(42) R. DAVIES, J.P. FOLKES, E.F. GALE und L.C. BIGGER, Biochem. J. 54, 430 (1953)

(43) K. RING, Angew. Chem. 82, 343 (1970)

(44) W. KUNDIG, F. KUNDIG, B. ANDERSON und S. ROSEMANN, J. Biol. Chem. 241, 3243 (1966)

(45) D. ROGERS und F. YU, J. Bacteriol. 84, 877 (1962)

(46) H.-R. KABACK, Ann Rev. Biochem. 39, 561 (1970)

(47) TH. GÜNTHER, U. ZIMMERMANN und G. PILWAT, in Vorbereitung

(48) W. ATZPODIEN und H. BODE, Europ. J. Biochem. 12, 126 (1970)

(49) E.G. AFTING, D. RUPPERT, K. HAGMEIER und H. HOLZER, Arch. Biochem. Biophys. 143, 587 (1971)

(50) W. HEMPFLING, in: B. Chance, R.W. Estabrock und J.R. Williamson, Control of Energy Metabolism, Academic Press 1965

(51) M.H. ZARLENGO und A. ABRAMS, Biophys. Acta 71, 65 (1963)

(52) O.H. LOWRY und J.V. PASSONNEAU, Naunyn-Schmiedebergs. Arch. ex. Path. u. Pharmak. 248, 185 (1964)

(53) F.M. HAROLD und J.R. BAARDA, J. Biol. Chem. 244, 2261 (1969)

(54) G.R. CLEAVES und P.S. COHEN, J. Bacteriol. 103, 697 (1970)

(55) M. LUBIN, Biochim. Biophys. Acta 72, 345 (1963)

(56) U. CASHEL und J. GALLANT, J. Mol. Biol. 34, 317 (1968)

(57) A.M. RYAN und E. BOREK, in: Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, eds. J.N. Davidson and W.E. Cohn, 11, 193 (1971)

(58) G. EDLIN und P. BRODA, Bact. Rev. 32, 206 (1968)

(59) J. IRR und J. GALLANT, J. Biol. Chem. 244, 2233 (1969)

Diese Arbeit wurde im Institut für Physikalische Chemie der Kernforschungsanlage Jülich GmbH (Direktor: Prof. Dr. K. Wagener) in der von Herrn Priv. Doz. Dr. U. Zimmermann geleiteten Abteilung "Membranforschung" durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Th. Günther, Zentralinstitut für Biochemie und Biophysik der Freien Universität Berlin, und Herrn Priv. Doz. Dr. U. Zimmermann möchte ich für die Bereitstellung des Themas sowie für zahlreiche Anregungen und fruchtbare Diskussionen meinen besten Dank sagen.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. K. Wagener für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und für seine großzügige Unterstützung.

Lebenslauf

Als Sohn des Fleischermeisters Gerhard Pilwat und seiner Ehefrau Charlotte, geb. Neuendorf, wurde ich am 8. Mai 1939 in Berlin geboren.

Seit Herbst 1945 besuchte ich die 10. Volksschule in Berlin-Wilmersdorf, nach unserem Umzug nach Charlottenburg im Herbst 1949 die 1. Volksschule in Berlin-Charlottenburg.

Seit Herbst 1951 besuchte ich die 1. Oberschule Technischen Zweiges in Berlin-Charlottenburg, die ich im Frühjahr 1955 mit der mittleren Reife abschloß.

Vom Frühjahr 1955 bis zum Herbst 1958 erlernte ich am Institut für Technische Chemie der Technischen Universität Berlin den Beruf des Chemielaboranten. Nach erfolgreichem Abschluß meiner Ausbildung erhielt ich eine Anstellung als Chemielaborant bei der Firma Schering AG in Berlin und danach im Hahn-Meitner-Institut für Kernforschung Berlin, Sektor Kernchemie, dem ich bis zum Frühjahr 1962 angehörte.

Neben meiner beruflichen Tätigkeit besucht ich vom Frühjahr 1959 an abends die private Oberschule Wissenschaftlichen Zweiges Dr. H. Stachowiak.

Im Herbst 1961 bestand ich die Extraneer-Reifeprüfung vor dem Prüfungsausschuß des Senators für Volksbildung in Berlin.

Im April 1962 begann ich das Studium der Chemie an der Technischen Universität Berlin, an der ich im Frühjahr 1968 die mündliche Diplomprüfung bestand. Meine Diplomarbeit führte ich anschließend bis zum Dezember 1968 im Hahn-Meitner-Institut für Kernforschung Berlin durch.

Meine Doktorarbeit begann ich bei Herrn Prof. Dr. Th. Günther und Herrn Priv. Doz. Dr. U. Zimmermann im Institut für Physikalische Chemie der Kernforschungsanlage Jülich GmbH (Direktor: Prof. Dr. K. Wagener).